



Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
(Direktor: Prof.Dr.Dr.Ingolf Cascorbi)
im Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Kiel

**ERFASSUNG DER WIRKSAMKEIT DER JNK-INHIBITOREN XG102
UND XG10X IM MODELL DER TNBS-INDUZIERTEN KOLITIS IN
BALB/C MÄUSEN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

LEONIE NIEDERGASSEL

aus **Bielefeld**

Kiel (2012)

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Herdegen, Institut für Experimentelle und
Klinische Pharmakologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Nebel, Institut für Klinische Molekularbiologie

Tag der mündlichen Prüfung: 10.06.2013

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 10.06.2013

gez.: Prof. Dr. Laudes

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	S. 4
Tabellenverzeichnis.....	S. 6
Abkürzungsverzeichnis.....	S. 7
1. Einleitung.....	S.8
1.1 Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen (CED).....	S. 8
1.1.2 Pathogenese der CED.....	S. 9
1.1.3 Physiologische Immunreaktion der Darmmukosa.....	S. 9
1.1.4 Immunpathologie des Morbus Crohn.....	S.12
1.1.5 Pharmakotherapie.....	S.12
1.2 JNK.....	S.13
1.2.1 Rolle der MAPK.....	S.13
1.2.2 c-Jun-N-Kinasen.....	S.14
1.2.3 Rolle der JNK in CED.....	S.15
1.2.4 JNK-Inhibitoren.....	S.16
1.3 Wissenschaftliche Fragestellung.....	S.17
2. Material und Methoden.....	S.18
2.1 Material.....	S.18
2.2 Versuchstiere.....	S.19
2.3 Durchführung der TNBS-Kolitis.....	S.19
2.3.1 Versuchsdurchführung.....	S.19
2.3.2 Darmpräparation und Gewinnung von Gewebematerial.....	S.21
2.3.3 Ausschluss und Ende des Versuches.....	S.21
2.4 Bestimmung der Kolitis.....	S.22
2.4.1 Klinischer Score.....	S.22
2.4.2 Histologischer Score.....	S.23
2.5 H+E- Färbung.....	S.24

3. Ergebnisse	S.25
3.1 Morphologische und histologische Analyse einer TNBS-Kolitis	S.25
3.2 H+E Scoring	S.31
3.3 XG102	S.33
3.3.1 XG102 subkutan	S.33
3.3.1.1 XG102 subkutan Set 1-3	S.33
3.3.1.2 XG102 subkutan Set 4	S.39
3.3.1.3 XG102/XG10X subkutan Set 5-6	S.45
3.3.1.4 Subkutane Preexposition von XG102	S.51
3.3.2 Intravenöse Applikation von XG102	S.57
3.3.3 Perorale Applikation XG102 Set 1-3	S.62
4. Diskussion	S.68
4.1 Limitationen	S.68
4.2 Diskussion der Ergebnisse	S.70
4.2.1 Subkutane Applikation von XG102/XG10X	S.72
4.2.2 Intravenöse Applikation von XG102	S.74
4.2.3 Perorale Applikation von XG102	S.75
5. Fazit und Ausblick	S.76
6. Zusammenfassung	S.77
7. Literaturliste	S.79
Danksagung	S.84
Eigenständigkeitserklärung	S.85
Lebenslauf	S.86
Appendix	S.87

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	T-Zelldifferenzierung und Antigenprozessierung innerhalb der Darmmukosa.....	S.11
Abb. 2	Aktivierungskaskade der MAP-Kinasen.....	S.14
Abb. 3	Übersicht über die derzeitigen JNK- Inhibitoren.....	S.16
Abb. 4.	Kolonquerschnitt einer Maus zur Vorstellung der Messparameter.....	S.25
Abb.5	Zählung der Immunzellen.....	S.26
Abb. 6	Ulzeration (repräsentative Abbildungen).....	S.27
Abb. 7	Krypten (repräsentative Abbildungen).....	S.28
Abb. 8	Submukosa (repräsentative Abbildungen).....	S.29
Abb. 9	Infiltration (repräsentative Abbildungen).....	S.30
Abb. 10	Histologische Änderung von XG 102 Set 1-3.....	S.35
Abb. 11	Korrelation der histologischen Änderung gegen den DAI XG102 Set 1-3....	S.37
Abb. 12	Korrelation der histologischen Änderung gegen den Gewichtsverlust XG102 Set 1-3.....	S.38
Abb. 13	Histologische Änderung von XG102 Set 4.....	S.41
Abb. 14	Korrelation der histologischen Änderung gegen den DAI XG102 Set 4.....	S.43
Abb. 15	Korrelation der histologischen Änderung gegen den Gewichtsverlust XG102 Set 4.....	S.44
Abb. 16	Histologische Änderung von XG102 Set 5-6.....	S.47
Abb. 17	Korrelation der histologischen Änderung gegen den DAI XG102 Set 5-6...	S.49
Abb. 18	Korrelation der histologischen Änderung gegen den Gewichtsverlust XG102 Set 5-6.....	S.50
Abb. 19	Histologische Änderung von XG102 pre exposition.....	S.53
Abb. 20	Korrelation der histologischen Änderung gegen den DAI XG102 pre exposition.....	S.55
Abb. 21	Korrelation der histologischen Änderung gegen den Gewichtsverlust XG102 pre exposition.....	S.56
Abb. 22	Histologische Änderung von XG 102 i.v.....	S.58
Abb. 23	Korrelation der histologischen Änderung gegen den DAI XG102 i.v.....	S.60

Abb. 24	Korrelation der histologischen Änderung gegen den Gewichtsverlust XG102 i.v.....	S.61
Abb. 25	Histologische Änderung von XG102 p.o. Set 1-3.....	S.64
Abb. 26	Korrelation der histologischen Änderung gegen den DAI XG102 p.o. Set 1-3.....	S.66
Abb. 27	Korrelation der histologischen Änderung gegen den Gewichtsverlust XG102 p.o. Set 1-3.....	S.67

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	S.18
Tab. 2	Klinischer Score.....	S.22
Tab. 3	Optische Bewertung des Kolon.....	S.22
Tab. 4	Histologische Bewertung der H+E- Färbung.....	S.23
Tab. 5	Übersicht über die durchgeführten Versuchsreihen.....	S.32
Tab. 6	Histologische Daten von XG102 s.c. Set 1-3.....	S.36
Tab. 7	Histologische Daten von XG102 s.c. Set 4.....	S.42
Tab. 8	Histologische Daten von XG102/XG10X s.c. Set 5-6.....	S.48
Tab. 9	Histologische Daten von XG102 pre exposition.....	S.54
Tab. 10	Histologische Daten von XG102 i.v.....	S.59
Tab. 11	Histologische Daten von XG102 p.o. Set 1-3.....	S.65

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CED	Chronisch Entzündliche Darmerkrankung(en)
DAI	<i>Disease Activity Index</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	Extracellular-Signal Regulated Kinase
HE	Hämatoxylin-Eosin
IFN γ	Interferon Gamma
IL-1 β	Interleukin-1 Beta
IL-4	Interleukin-4
IL-5	Interleukin-5
IL-12	Interleukin-12
IL-13	Interleukin-13
IL-18	Interleukin-18
JNK	c-Jun N-terminale Kinase(n)
LPS	Lipopolysaccharide
MAdCAM-1	<i>Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
p38MAPK	p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase
SAPK	Stress-aktivierte Protein-Kinase(n)
TGF- β	<i>Transforming growth factor</i> Beta
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor Alpha
TLR	Toll-Like- Rezeptor
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure

1. Einleitung

1.1 Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa sind Formen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit schubartig destruierendem Verlauf. Die jährliche Inzidenz beträgt in Europa etwa 6-11 Fälle pro 100.000 Einwohner (Sina et al. 2006). Auch wenn sich die klinischen Symptome wie Abdominalschmerzen, Diarrhoe, Blut im Stuhl und Fieber bei beiden Erkrankungen ähneln, sind sie durch ihre Lokalisation, Ausbreitung und immunologische Reaktion voneinander abzugrenzen.

Bei Morbus Crohn handelt es sich um eine transmurale, granulomatöse Entzündung, die im gesamten Gastrointestinaltrakt auftreten kann, wobei der diskontinuierliche, segmentierte Befall kennzeichnend ist. Histologisch ist das Infiltrat durch Lymphozyten, Eosinophile und Histiozyten gekennzeichnet. Die Pathophysiologie ist Gegenstand intensiver Forschung. Neben einer erwiesenen genetischen Komponente durch das NOD2-/CARD15 Gen werden Umwelteinflüsse, Ernährung, Antibiotika sowie eine erworbene Intoleranz gegenüber der mikrobiellen Flora des Darms angenommen (Rosenstiel et al. 2009).

Die Colitis Ulcerosa ist vor allem auf das Kolon begrenzt und durch eine sich kontinuierlich auf den Mastdarm ausbreitende Entzündung gekennzeichnet. Sie betrifft nur die oberen Mukosaschichten. Die Erkrankung geht mit nekrotisierendem Epithel sowie Ödemen und hämorrhagischen Episoden einher. Beim Infiltrat handelt es sich vor allem um neutrophile Granulozyten. Neben systemischen Komplikationen birgt diese Krankheit vor allem ein erhöhtes Dickdarmkarzinomrisiko (Pohl et al. 2000).

1.1.2 Pathogenese der CED

Wie oben schon genannt, gilt die Pathogenese als unklar, aber es gibt Hinweise auf genetische, immunologische, umweltbedingte und psychische Kofaktoren (Rosenstiel et al. 2009). Vermutlich handelt es sich um eine determiniert überschießende immunologische Reaktion auf intestinale Antigene (van Montfrans et al. 2002).

Der Gastrointestinaltrakt gilt durch seine große Zahl immunkompetenter Zellen als ein wichtiges Immunorgan des Menschen. Sein ständiger Kontakt mit fremden Antigenen prädisponiert ihn zu großer Antigenvielfalt und häufigen Immunreaktionen (van Montfrans et al. 2002, Wirtz et al. 2000).

Die Darmwand besitzt eine wichtige Schutz- und Barrierefunktion, sodass eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität als wichtiger Einflussfaktor in der Entwicklung von CED angenommen wird (Wirtz et al. 2007).

Bei einem gesunden Menschen werden Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten und Makrophagen eng kontrolliert. Somit tolerieren die Lamina propria – Lymphozyten die eigene Darmflora und deren Antigene. Ist das natürliche Gleichgewicht zwischen Mukosa und Dickdarmflora gestört, verlieren die Darmzellen ihre Toleranz gegenüber bakteriellen Produkten (Xavier et al. 2007). Durch eine daraus resultierende überschießende immunologische Antwort werden vermehrt proinflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-1 und IL-2 ausgeschüttet, welche zur weiteren Entzündungsreaktion und somit zur Gewebeschädigung in Form von Erosion, Nekrosen und Ulzerationen beitragen.

1.1.3 Physiologische Immunreaktion der Darmmukosa

Die Mukosa des Gastrointestinaltraktes enthält eine große Anzahl von dendritischen Zellen, die der Aufnahme, Verarbeitung und dem Weitertransport von Antigenen hin zu lokalen Lymphknoten dienen. Dendritische Zellen erzeugen ihre Immunantwort mittels T- Zellen, wobei sie für deren Entwicklung von naiven T- Zellen zu T- Effektor- Zellen oder regulatorischen T- Zellen sowie für deren Anergie und Apoptose verantwortlich sind (Banchereau et al. 2000, Huang et al. 2000, Jonuleit et al. 2001).

Dendritische Zellen exprimieren die sogenannten Toll-like-Rezeptoren (Dabbagh et al. 2003), die die Lipopolysaccharide (LPS) der Antigene erkennen und in Rückkopplung eine Immunantwort erzeugen.

Nach Aufnahme eines Antigens beginnen die dendritischen Zellen, den Zytokin-Rezeptor CCR-7 zu exprimieren, der auch auf naiven T- Zellen zu finden ist (Campbell et al. 1998).

Haben dendritische Zellen den naiven T- Zellen ein aufgenommenes Antigen präsentiert, differenzieren sich diese in CD4+ -Effektor- Zellen, CD4+ - Gedächtniszellen oder in CD8+ zytotoxische Zellen.

Abhängig von den Zytokinen, die sie sezernieren, differenzieren die CD4+-T- Zellen in zwei Kategorien von Helferzellen, Th1 und Th2 – Zellen (Bass et al. 1989). Th1-Zellen produzieren die proinflammatorischen Zytokine IL-2 und IFN γ und dienen der Abwehr intrazellulärer Pathogene (zelluläre Immunantwort), während Th2- Zellen IL-4, IL-5 und IL-13 sezernieren und gegen extrazelluläre Pathogene wirken, indem sie die Produktion von Antikörpern durch B- Zellen stimulieren (humorale Immunantwort).

IL-12 induziert gemeinsam mit IL-18 die Differenzierung von Th1- Zellen (Okamura et al. 1995) und IL-4, das von NK- Zellen, Mastzellen, basophilen Granulozyten und reifen CD4+-Zellen produziert wird und fördert die Th2-Differenzierung (Swain et al. 1990). Weitere Faktoren der Differenzierung sind Antigen- Dichte (Hsieh et al. 1992), MHC- Haplotypen (Constant et al. 1995), Antigenpräsentierende Zellen und kostimulierende Faktoren (Abb. 1) (Howland et al. 2000).

Nach dem Priming von T- Zellen unter dem Einfluss von IL-12 und IL-18 rezirkulieren die Th1- Effektorzellen und die Gedächtniszellen vorzugsweise in die intestinale Mukosa zurück. Das Integrin $\alpha 4\beta 7$, das auf diesen T- Zellen exprimiert ist, dient als Hauptrezeptor im Darm und wirkt über eine Adhäsionskaskade in Interaktion mit dem mukosaeigenen Adressin MAdCAM- 1, das auf Endothelzellen exprimiert wird (Sprent et al. 2002). Im Darm angelangt, erzeugen die Th1- Effektor- Zellen eine inflammatorische Reaktion auf das Antigen, die noch verstärkt werden kann durch die Interaktion mit unreifen dendritischen Zellen. Nach Eliminierung des Pathogens wird ein Großteil der Effektorzellen überflüssig und gehen durch Apoptose zugrunde. Lediglich einige wenige werden zu langlebigen Gedächtniszellen (Abb.1) (Sprent et al. 2002).

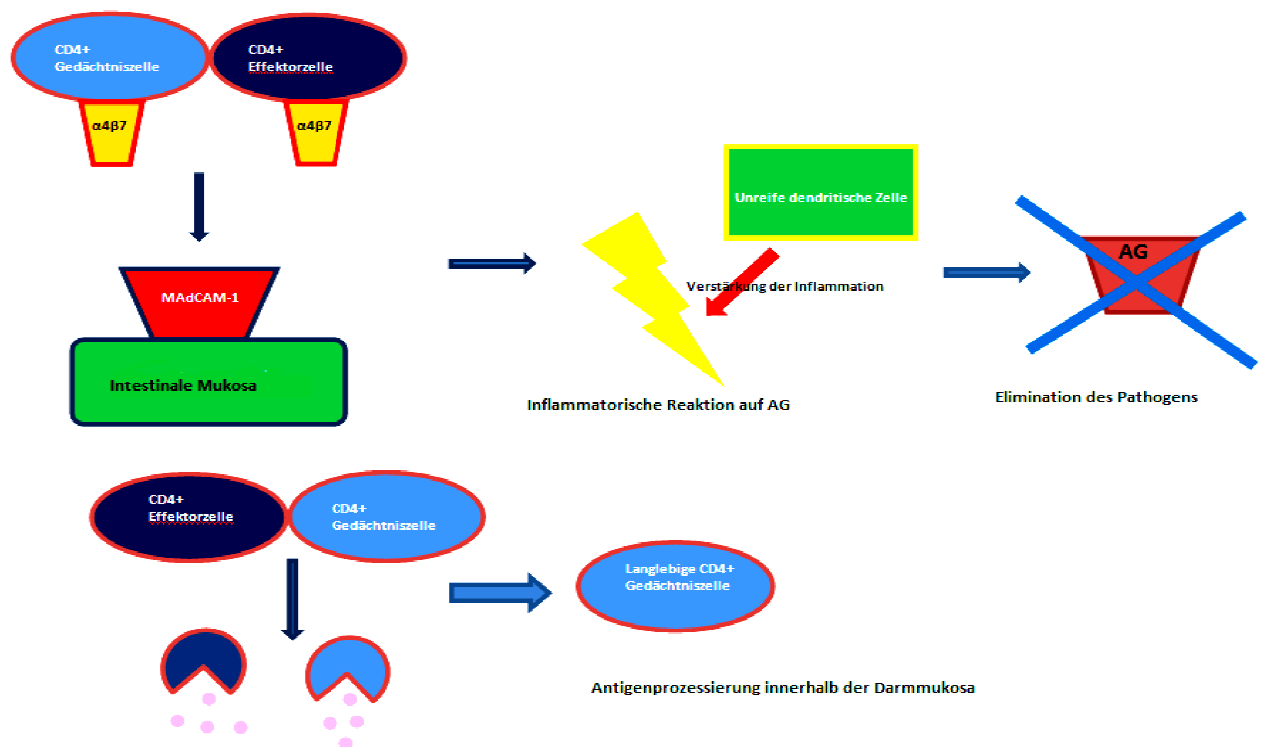
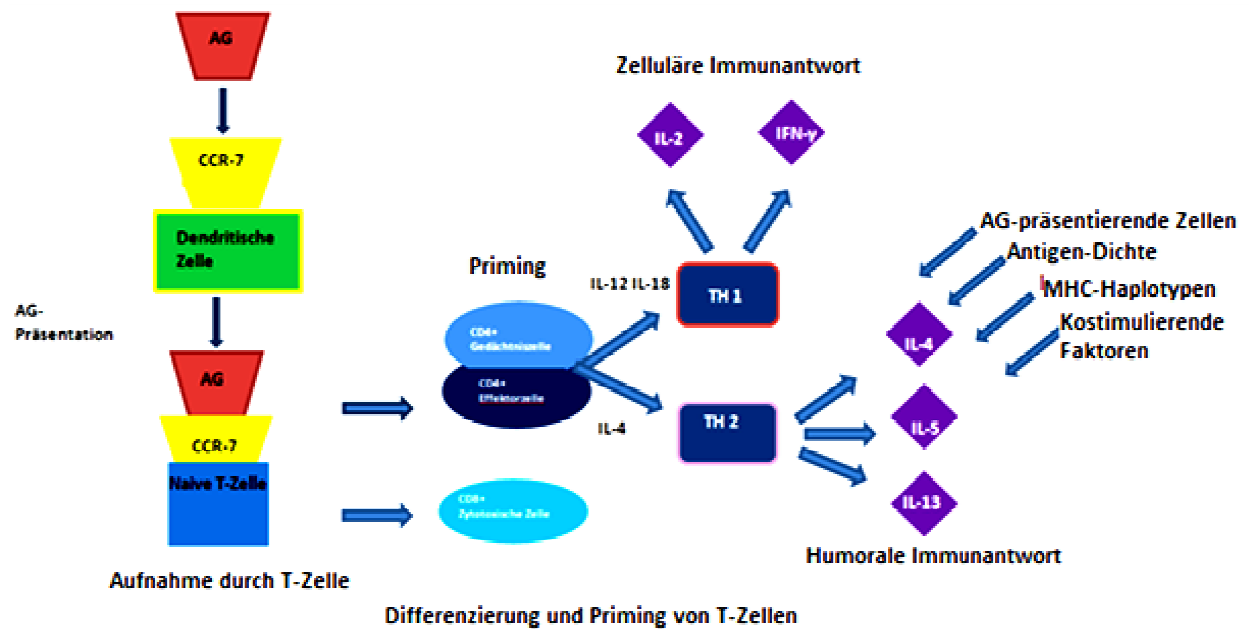


Abb. 1: T-Zelldifferenzierung und Antigenprozessierung innerhalb der Darmmukosa

1.1.4 Immunpathologie des Morbus Crohn

Klinische und experimentelle Studien haben den Beweis erbracht, dass verschiedene Defekte innerhalb der mukosalen Immunantwort für Morbus Crohn verantwortlich zeichnen. Basierend auf dem Überwiegen von IL-2 und IFN- γ sezernierenden T- Zellen und der spezifischen Expression der die Th1- Differenzierungen induzierenden Zytokine IL-12 und IL-18 in der intestinalen Mukosa, wird Morbus Crohn als Prototyp einer Th1-abhängigen Erkrankung angesehen (Parronchi et al. 1997, Monteleone et al. 1997). Zwei weiterführende Studien zeigten, dass die T- Zellen innerhalb der Mukosa bei Morbus Crohn-Patienten resistent gegenüber Apoptose sind (Baird et al. 1999). Im Folgenden konnte eine deutlich erhöhte Anzahl von dendritischen Zellen, die IL-12 und IL-18 produzieren, in der intestinalen Mukosa von Patienten mit Morbus Crohn nachgewiesen werden (van Montfrans et al. 2003). Ein weiteres Kennzeichen für Morbus Crohn ist die erniedrigte Produktion des Zytokins IL-10, das in gesunden Individuen in Interaktion mit TGF- β die Regulierung von CD4⁺ T-Effektor- Zellen und damit die Apoptose nach erfolgter Immunreaktion bewirkt (Autschbach et al. 1998).

1.1.5 Pharmakotherapie

In der Therapie der CED wird grundsätzlich unterschieden zwischen Schubtherapie und Remissionserhaltung. In der Schubtherapie steht die Linderung der akuten Symptome im Vordergrund, während bei der Remissionserhaltung die Beschwerdefreiheit über einen möglichst langen Zeitraum aufrecht erhalten werden soll.

In der Schubtherapie gelten Aminosalicylate wie Mesalazin als Mittel der ersten Wahl, das zusätzlich in besonders schweren Fällen in Kombination mit Glukokortikoiden (Prednisolon) und Antibiotika (Metronidazol/Ciprofloxacin) verwendet wird. Zur Remissionserhaltung dienen Immunsuppressiva wie Azathioprin, 6- Mercaptopurin, Methotrexat und Mesalazin in niedriger Dosierung (Pithadia et al. 2011).

Weiterhin haben sich in einigen Fällen die TNF α – Blocker Infliximab und Adalimumab als wirksam erwiesen im Sinne einer systemischen Antikörper (Pithadia et al. 2011).

Problematisch ist jedoch bei allen Medikamenten ihr pleiotropes Wirkungsspektrum sowie die nach wie vor nicht vollständig erforschte Ätiologie der CED. Aus diesem Grund ist derzeit noch keine Heilung der Erkrankungen möglich.

Daher besteht die Notwendigkeit, neue Therapieansätze zu untersuchen und neue Therapieoptionen zu entwickeln.

1.2 JNK

1.2.1 Rolle der MAPK

Die Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) sind in allen eukaryoten Zellen vorkommende, evolutionär hochgradig konservierte Enzyme, die eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellwachstum, Differenzierung, Entzündung und Apoptose einnehmen.

Sie nehmen externe Stimuli auf und leiten sie weiter, indem sie Phosphorylierungskaskaden auslösen, um eine zelluläre Reaktion hervorzurufen. Die MAPK sind Serin-/Threonin-spezifische Proteinkinasen, die die zelluläre Aktivität, wie die Genexpression, die Mitose, die Differenzierung sowie die Apoptose bzw. das Überleben der Zelle regulieren.

Derzeit sind vier bestimmte Gruppen von MAPKs bekannt:

Die extrazelluläre Signalkinase ERK1/2, die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK 1-3), die p38 MAPK (p38 α , β , γ und δ) und die ERK 5.

Sie können die Aktivität anderer zytoplasmatischer Enzyme durch Phosphorylierung an Serin-/Threonin-Aminosäurereste verändern. Die MAPK selbst werden durch doppelte Phosphorylierung an einem Threonin- und einem Tyrosinrest aktiviert. Dies erfolgt durch aktivierte MAPKinasen-Kinasen (MAPKK). Sie phosphorylieren die MAPK immer an einer Threonin-XXX-Tyrosin-Sequenz, deren mittlere Aminosäure XXX spezifisch für eine der MAPK-Hauptgruppen ist. So lautet die Zielsequenz für die Gruppe der ERK Threonin-Glutamat-Tyrosin. Bei den p38-Proteinkinasen enthält die Sequenz Glycin und die Gruppe der JNK bietet Threonin-Prolin-Tyrosin als Angriffspunkt für die MAPKK.

ERK MAPKinasen werden von den MKK1 und MKK2 aktiviert, p38 von MKK3, MKK4 und MKK6 (Abb. 2).

JNK wird von den MKK 4/7 aktiviert. Diese MAPKK werden wiederum aktiviert durch MAPKinasen Kinasen Kinasen (MAPKKK). Um MAPKKK, zu denen auch das c-Raf Protoonkogen gehört, von einem inaktiven Zustand in einen aktiven zu versetzen, bedarf es verschiedener Stimuli wie Wachstumsfaktoren, inflammatorischer Zytokine, chemischer Noxen und Strahlenbelastungen (Abb. 2).

In ihrer Form als Downstream-Regulatoren beeinflussen die MAPKs Transkriptionsfaktoren, deren Phosphorylierung, direkt oder indirekt, die Genexpression an mehreren Punkten reguliert. Dazu gehören u.a. die Transkription, die nukleäre Ausschleusung sowie mRNA-Stabilität und –Translation (Avruch 2001). Die zellulären Konsequenzen bei MAPK-Aktivierung beinhalten Inflammation, Apoptose, Differenzierung und Proliferation (Broom et al. 2009).

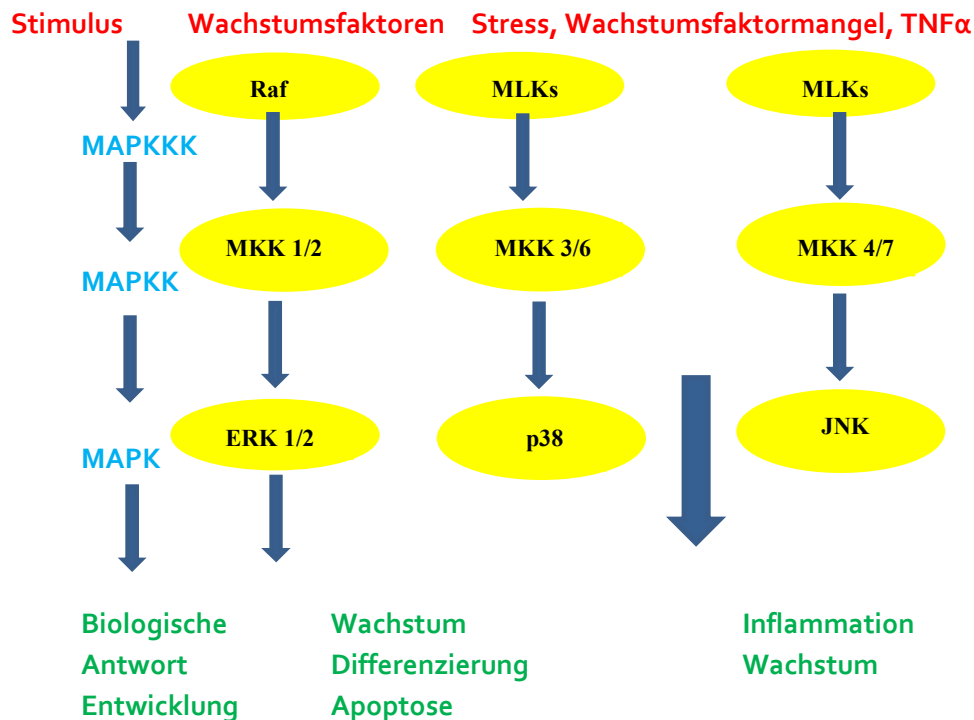


Abb. 2: Aktivierungskaskade der MAP-Kinasen
(modifiziert nach: Centre of Biochemistry, Michigan State University, USA)

1.2.2 c-Jun-N- Kinasen

JNK werden auch als *stress-activated-protein-kinases* (SAPK) bezeichnet, da sie durch zellulären Stress wie UV- Strahlung, Radikale und Nährstoffentzug aktiviert werden.

Die JNK werden durch ihre drei Gene JNK1, JNK2 und JNK3 kodiert. Während JNK 1 und JNK 2 ubiquitär im Körper vorkommen, werden JNK 3 nur im Herzen, im Gehirn und im Hoden exprimiert (Waetzig und Herdegen, 2005). Insgesamt sind zehn Isoformen von JNK bekannt. Ein Teil entsteht durch alternatives Spleißen am C-terminalen Ende, während für JNK 1 und JNK 2 sowohl ein α - als auch ein β - Exon vorhanden sind (Waetzig und Herdegen, 2005).

Die Rolle der JNK in der Physiologie und der Pathologie ist vor allem aus biochemischen Studien und Mausmodellen bekannt, in denen unterschiedliche JNK-Isoformen oder Upstream- Regulatoren zerstört wurden durch gezielten, homologen Gen- Knockout (Kuida et al. 2004). JNK/SAPKs spielen eine wichtige Rolle in chronisch entzündlichen Erkrankungen, die die Expression spezieller Proteasen und Zytokine beinhalten (Karin et al. 2005). Das proinflammatorische Zytokin $\text{TNF}\alpha$ wird unter anderem durch die JNK- Signalkaskade aktiviert (Waetzig et al.2002).

Die JNK sind in der Lage, die $\text{TNF}\alpha$ - induzierte Apoptose zu antagonisieren (Reuther-Madrid et al. 2002). Sie können aber auch gegenteilig wirken und über $\text{TNF}\alpha$ eine Apoptose

induzieren (Guo et al. 1998, De Smaele et al. 2001, Tang et al. 2001, Deng et al. 2003, Papa et al. 2004, Varfolomeev et al. 2004). Weiterhin zeigten genetische Studien an *Drosophila*, dass JNK auch durch TNF α aktiviert werden und eine Apoptose verursachen können (Waetzig et al. 2002).

JNK wurden u.a. nachgewiesen bei Diabetes (Induktion einer Insulinresistenz), Hörverlust, Apoplex, Makuladegeneration, Morbus Parkinson, Alzheimer und autoimmunen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis (Haeusgen et al. 2009, Milano et al. 2007, Thakur et al. 2007). Jedoch besitzen die JNK auch physiologische Funktionen bei der Mitose und der Differenzierung neuronaler Strukturen (Waetzig und Herdegen 2005).

1.2.3 Rolle der JNK in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

In der intestinalen Entzündungsreaktion spielen die c- Jun-N-terminalen Kinasen (JNK) eine wichtige Rolle (Hommes et al. 2003), da sie sowohl die Expression von Zytokinen wie TNF α , IL-2 und IL-6 regulieren, als auch die Reifung und Aktivierung von T- Zellen.

Dabei zeigt sich eine erhöhte Aktivität von JNK in Interaktion mit ERK und p38 MAPK (Milano et al. 2007) in Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa sowie eine erhöhte JNK-Phosphorylierung in einer aktiven intestinalen Entzündung verglichen mit gesundem Darmgewebe von CED- Patienten, wobei sowohl der ELISA- Test als auch die immunhistochemischen Färbungen eine hohe Aktivierung in entzündetem Gewebe zeigten (Mitsuyama et al. 2006). Phospho- JNK wurde u.a. nachgewiesen in Darmzellen, Makrophagen und Lymphozyten, vor allem im Nukleus. Diese Ergebnisse validieren diejenigen aus *in vitro*- Studien (Roy et al. 2008).

Eine erhöhte Aktivität von JNK wurde in Patienten nachgewiesen, die eine Steroidresistenz im Verlauf ihrer Morbus Crohn- Therapie entwickelten (Bantel et al. 2002).

In weiterführenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von JNK1 und JNK2 im Tiermodell nicht vor der Entwicklung einer Kolitis schützt und eine vollständige Zerstörung von JNK2 sogar eine Verstärkung der Entzündung hervorruft (Chromik et al. 2007).

Aufgrund dieser Forschungsergebnisse und der JNK-Hemmung als potentieller Therapieoption sind bisher 60 verschiedene JNK- Hemmstoffe publiziert und/ oder patentiert worden.

1.2.4 JNK- Inhibitoren

Die JNK- Inhibitoren werden anhand ihrer Wirkweise unterschieden. Dabei wird eine Einteilung unternommen in ATP-kompetitive Hemmstoffe und nicht ATP- kompetitive Hemmstoffe. Einen Überblick über die derzeit gängigen Inhibitoren gibt Abb. 3.

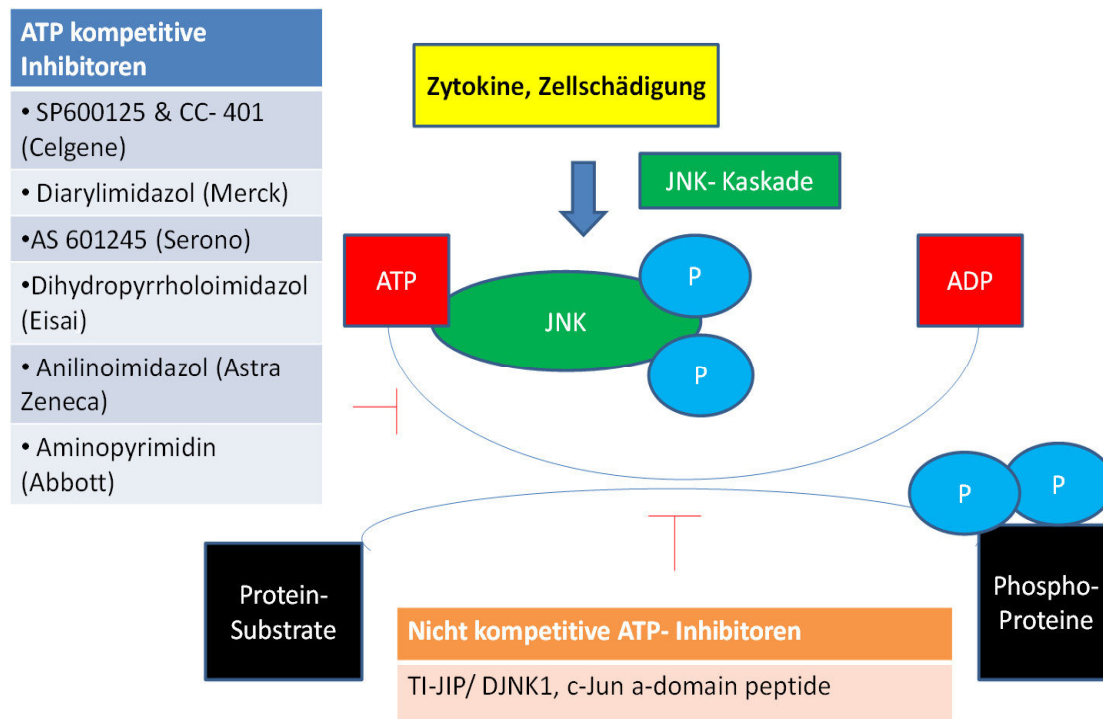


Abb.3: Übersicht über die derzeitigen JNK- Inhibitoren (modifiziert nach Bogoyevitch et al. 2008)

Der bekannteste und im Zusammenhang mit muriner Kolitis am besten erforschte Wirkstoff ist der ATP-kompetitive Hemmstoff SP 600125, ein Anthrapyrazolon- Inhibitor von JNK (Celgene). SP 600125 hemmt spezifisch JNK2 mit einer hohen Affinität zur ATP-Bindungsstelle (Bennett et al. 2001). Seine antientzündliche Wirkung entfaltet der Wirkstoff über eine Hemmung der p38 MAPK- Kaskade.

Im murinen Kolutismodell konnte mit SP600125 eine Reduktion von Ulzeration und Infiltration erzielt werden. Ebenso signifikant konnte eine Senkung der Th1- abhängigen Zytokine IFN γ , IL-6 und IL-12 nachgewiesen sowie eine Reduktion der Apoptoserate beobachtet werden (Assi et al. 2006).

Auch die JNK-Inhibitoren XG102 und XG104 (XIGEN, Lausanne) haben sich bereits als wirksam erweisen können und sollen nachfolgend in dieser Arbeit näher untersucht werden.

1.3 Wissenschaftliche Fragestellung

In dieser Dissertation sollen die JNK- Hemmstoffe XG102 und XG10X näher untersucht werden hinsichtlich ihrer Wirksamkeit. Dies erfolgt im Modell der TNBS-induzierten Kolitis in BALB/C Mäusen. Laut der Biotechnologiefirma XIGEN (Lausanne) gilt bei den Versuchen mit diesen JNK- Inhibitoren das TNBS- Modell als Methode der Wahl, da dieses bereits in Vorversuchen (XIGEN unveröffentlicht) eine dem Morbus Crohn entsprechende Immunpathologie gezeigt hat.

In dieser Arbeit werden folgende Fragestellungen behandelt:

- Welche Auswirkungen haben die JNK- Inhibitoren XG102 und XG10X auf die histologischen Parameter, bestehend aus:
 - Kryptenstruktur
 - Ulzerationen
 - Infiltraten?
- Welche Wirkung haben die JNK-Inhibitoren XG102 und XG10X auf die klinischen Parameter, also den Disease-Activity-Index (DAI), der sich zusammensetzt aus:
 - Gewichtsverlust
 - Stuhlkonsistenz
 - Blut im Stuhl?
- Besteht eine Korrelation zwischen Histopathologie und klinischem Zustand?

2. Material und Methoden

2.1 Material

Die folgende Tabelle beinhaltet alle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien:

Tabelle 1: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Eosin	Merck/VWR, Darmstadt
Eisessig	Merck/VWR, Darmstadt
Ethanol 99,9%	Büfa Chemikalien GmbH, Hude/Althausen
Ethidiumbromid	Invitrogen, Karlsruhe
Hämatoxylin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HCl	Merck/VWR, Darmstadt
Sulfasalazin	Sigma Aldrichs, München
TNBS	Sigma Aldrichs, München
Ultra Pure Water	Biochrome AG, Berlin
Xylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 7 Wochen alte, 16,5 -19 g schwere weibliche BALB/c Mäuse aus dem Charles River Institut, Sulzfeld, verwendet. BALB/c-Mäuse haben sich erfahrungsgemäß bei Versuchen mit TNBS-induzierter Kolitis als der am besten geeignete Stamm erwiesen. Nach einer Gewöhnungsphase an die neue Umgebung von fünf Tagen wurden die Mäuse in den Versuch aufgenommen. Sie wurden in Einzelkäfigen in einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und erhielten Standardmäusefutter sowie Trinkwasser ad libitum. Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes durch das Ministerium für Landwirtschaft des Landes Schleswig-Holstein genehmigt (V 312-72241.121-22 (60-6/08)).

2.3 Durchführung der TNBS –Kolitis

2.3.1 Versuchsdurchführung

Die TNBS-Applikation und XG102/10X-Gabe wurde von Frau Dr. rer. nat. Kirstin Reinecke durchgeführt.

Die H+E-Schnitte wurden doppelt blind ausgewertet.

Bei den Mäusen wurde mithilfe einer TNBS-Lösung eine akute Kolitis induziert.

Hierzu wurde den Mäusen nach der CO₂ - Anästhesie 80 µl der TNBS – Lösung mit einer Plastikkanüle vorsichtig intrarektal appliziert. Nach Entfernung des Katheters wurden die Mäuse für ca. 30 Sekunden mit dem Kopf nach unten in eine vertikale Haltung gebracht. Der hohe Ethanolanteil in der TNBS – Lösung dient zur Überwindung der Epithelbarriere. Dadurch kann das TNBS direkt wirken.

Unmittelbar vor der TNBS-Applikation wurde ausgewählten Tieren XG 102, XG 10X oder Kochsalz in unterschiedlicher Konzentration subkutan gespritzt. Eine weitere Gruppe bekam Sulfasalazin via Gavage verabreicht.

XG-102 (MZ3325 Batch C)

100 µg/kg	0,53 µl in 1000 µl Kochsalzlösung
50 µg/kg	0,53 µl in 2000 µl Kochsalzlösung
10 µg/kg	1:5 Verdünnung der 50 µg/kg-Lösung
1 µg/kg	1:100 Verdünnung der 100 µg/kg-Lösung

XG-102 (MZ3325 Batch C)

100 µg/kg	0,53 µl in 1000 µl Kochsalzlösung
50 µg/kg	0,53 µl in 2000 µl Kochsalzlösung
10 µg/kg	1:5 Verdünnung der 50 µg/kg-Lösung
1 µg/kg	1:100 Verdünnung der 100 µg/kg-Lösung
0,2 µg/kg	1:5 Verdünnung der 1 µg/kg –Lösung

XG- 10X (HF35298E)

50 µg/kg	1,9 µl in 1000 µl Kochsalz
10 µl/kg	1:5 Verdünnung der 50 µg/kg-Lösung
2 µg/kg	1:25 Verdünnung der 50 µg/kg-Lösung

Sulfasalazin

0,032 g Sulfasalazin(S0883 Sigma) in 16 ml CMC-Gel (0,5 g Cetylmethylcellulose in 100 ml Wasser, über Nacht quellen lassen)

TNBS

1 Teil 5%iger TNBS Lösung (in Wasser gelöst): 1 Teil Ethanol absol.

2.3.2 Darmpräparation und Gewinnung von Gewebematerial

Zunächst erfolgten die Öffnung des Abdomens und die Entnahme der Gewebeproben. Anschließend wurde die Milz vermessen und danach, wie schon zuvor ein Leberlappen, in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die mesenterialen Lymphknoten wurden entfernt und ein Teil von ihnen in 4 % Paraformaldehyd eingelegt, die restlichen ebenfalls in Stickstoff gefroren.

Das Kolon wurde vollständig entfernt, vermessen, mit PBS gereinigt und in drei Abschnitte (proximal-medial-distal) unterteilt. Aus jedem Abschnitt wurde jeweils eine Probe in 4% Formalin eingebettet und eine Probe in flüssigem Stickstoff eingefroren. Aus dem Kolon transversum wurde ein 1x1 cm großes Fragment entfernt, in Zellkulturmedium(RPMI) eingebettet und für 24 h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) gelagert. Nach 24 h konnte das Medium in Eppendorffröhrchen überführt, zentrifugiert und der Überstand abpipettiert werden. Die Überstände wurden bei – 80°C für den ELISA aufbewahrt.

2.3.3 Ausschluss und Ende des Versuches

Mäuse, die nach der TNBS-Gabe einen Gewichtsverlust von mehr als 20% zeigten, wurden getötet und von der Studie ausgeschlossen.

Nach Beendigung der Versuche wurden alle Tiere mit CO₂ getötet und das Gewebe entnommen.

2.4 Bestimmung der Kolitis

2.4.1 Klinischer Score

Nach der Induktion der Kolitis wurden die Mäuse täglich begutachtet und gewogen. Anhand einer frischen Probe wurde der Stuhl auf Konsistenz und Vorhandensein von Blut (Haemoccult – Test von Beckman Coulter Ireland Inc) untersucht.

Jeder Parameter wurde nach der folgenden Tabelle bewertet:

Tabelle 2: Klinischer Score

Score	Gewichtsverlust [%]	Stuhlkonsistenz	Blut im Stuhl
0	0	Normal	Negativer Haemoccult
1	1 – 5		
2	5,1 – 10	Weich	Positiver Haemoccult
3	10,1 – 15		
4	> 15	Diarrhoe	Rektale Blutungen

Disease-Activity-Index:

Durch Addition der einzelnen Scores wurde jedem Tier ein *Disease Activity Index* (DAI) zugeordnet.

Die Bewertung des Darms (Tab.3) auf Ulcera und Rötungen erfolgte direkt nach der Entnahme und Reinigung.

Tabelle 3: Optische Bewertung des Kolon

Score	Parameter
0	keine Abnormalitäten
1	Ödeme oder Rötungen an einer Stelle
2	Ödeme oder Rötungen an mehreren Stellen, oder Ödeme und Rötungen, die mehr als 50% des Kolons betreffen
3	eine Ulzeration
4	mehr als eine Ulzeration oder eine schwerwiegende Ulzeration

2.4.2 Histologischer Score

Die in 4% -igem Paraformaldehyd eingelegten Darmabschnitte wurden in Paraffin eingebettet und mit dem Kryostat geschnitten. Die 0,5 µm dicken Schnitte wurden auf einen Objektträger gezogen und mit Hämatoxylin Eosin (H+E) eingefärbt.

Unter dem Elektronenmikroskop wurden die einzelnen Schnitte von zwei Personen unabhängig und verblindet nach Grad der Inflammation, Verdickung der Submucosa, Schädigung des Epithels und der Krypten sowie dem Vorhandensein von Ulcera beurteilt. Tab. 4)

Mit Hilfe eines Computerprogramms konnten die Dicke der Submucosa und die durchschnittliche Länge der Krypten vermessen werden.

Tabelle 4: Histologische Bewertung der H+E-Färbung

	Score	Parameter
Zellinflammation (Fläche 150pp x 150pp ~ 42,000 µm²)	0	Keine
	1	< 7 Immunzellen
	2	< 14 Immunzellen
	3	> 14 Immunzellen
Ödem (Dicke der Submukosa)	0	< 10 µm
	1	< 50 µm
	2	< 100 µm
	3	> 100 µm
Kriptenstruktur	0	Physiologische Strukturen
	1	Kriptenlänge < 30% reduziert
	2	Kriptenlänge > 30 % reduziert und Zerstörung der Becherzellen
	3	Verlust von Kriptenstruktur und Epithel
Ulzerationen	0	Intaktes Epithel
	1	Schädigung Lamina propria
	2	Schädigung der Submukosa
	3	Transmurale Ulzerationen

2.5 H + E - Färbung

Die auf Objektträger gezogenen Darmschnitte wurden mittels einer H+E (Hämatoxylin Eosin – Färbung) gefärbt.

Dafür wurden die Schnitte entwacht, indem sie zweimal zehn Minuten in Xylen eingetaucht wurden. Nach Dehydratisierung durch eine schnell absteigende Ethanolreihe (100%, 96%, 70%) wurden sie mit fließend Wasser gewaschen und sechs Minuten in Mayers Hämatoxylin Lösung getaucht. Darauf folgte eine kurze Differenzierung mit Ethanol-Säure. Nach wiederholtem Waschen wurden die Darmschnitte fünf Minuten in Eosin gefärbt. Zuletzt durchlief der Objektträger eine schnell aufsteigende Ethanolreihe (70%, 96%, 100%), 3x Xylen/ Alkohol und abschließend 3x Xylen.

Nach Trocknung der Objektträger wurden sie eingedeckelt.

Dazu wurden sie kurz in Xylen getaucht, 1-2 Tropfen Eukitt auf die Schnitte verteilt und langsam ein Deckgläschen blasenfrei auf den Objektträger gelegt.

Die Objektträger mussten über Nacht trocknen.

Durch die H+E- Färbung werden Kerne blau angefärbt, während das Zytoplasma, Kollagenfasern und Erythrozyten sich rot färben.

3. Ergebnisse

3.1 Morphologische und histologische Analyse einer TNBS-Kolitis

Die angefärbten Darmabschnitte wurden unter dem Mikroskop auf folgende Parameter untersucht: Ulzeration, Krypten, Submukosa und Infiltrat (Abb. 3). Obwohl die Immunzellen durch ihre verschieden geformten Zellkerne gut identifiziert werden konnten, reichte die Vergrößerung des Mikroskops nicht zur eindeutigen Unterscheidung aus. Somit wurden sie nur als Immunzellen gezählt (Abb. 4). Um sie ausreichend zellspezifisch darstellen zu können, müsste eine Immunfluoreszenz am fixierten Gewebe durchgeführt werden.

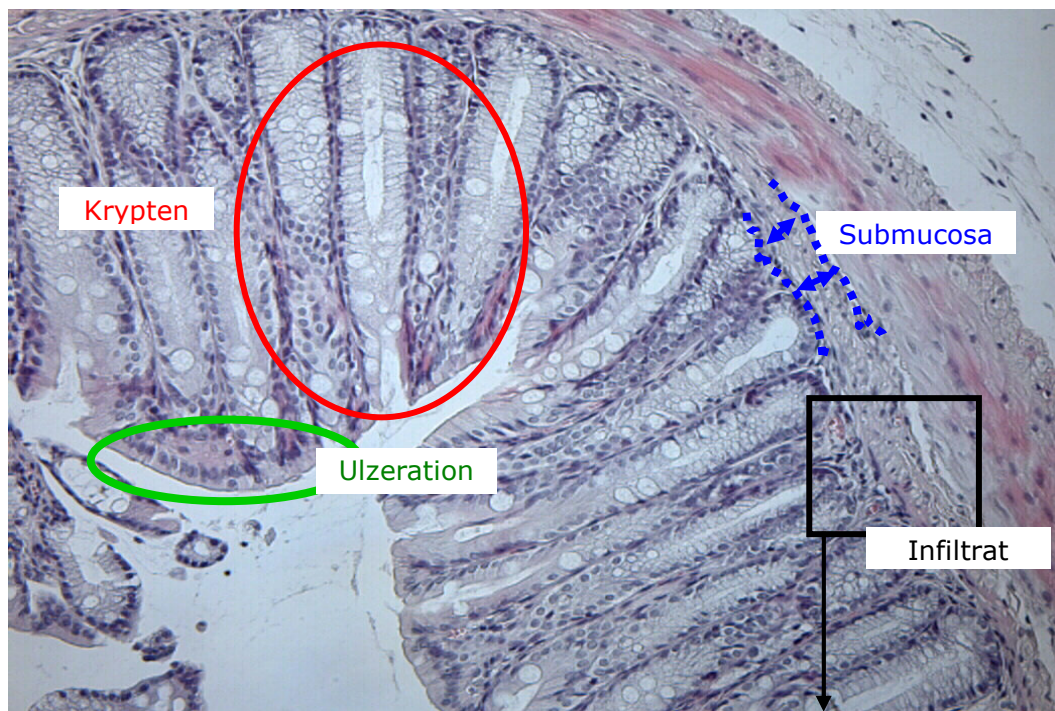


Abb. 4: Kolonquerschnitt einer Maus zur Vorstellung der Messparameter

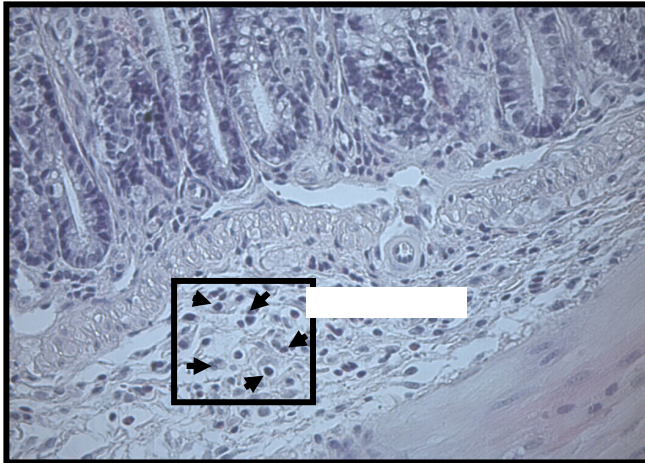


Abb.5: *Zählung der Immunzellen (400-fache Vergrößerung) auf einer Fläche von 150x150 pp*

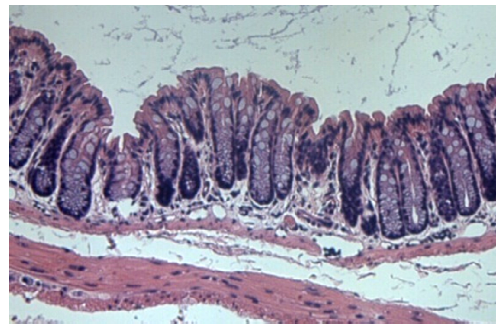
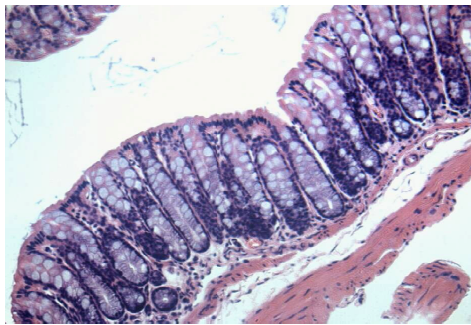
Im Folgenden sollen die einzelnen Messparameter anhand einiger Beispielbilder verdeutlicht werden. Dabei werden die unbehandelten Kontrolltiere, die mit TNBS und Kochsalzlösung behandelten Tiere sowie die mit XG102 behandelten Tiere vorgestellt.

Abb.6: Ulzeration (repräsentative Abbildungen)

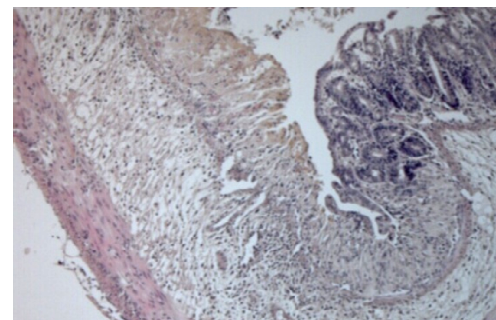
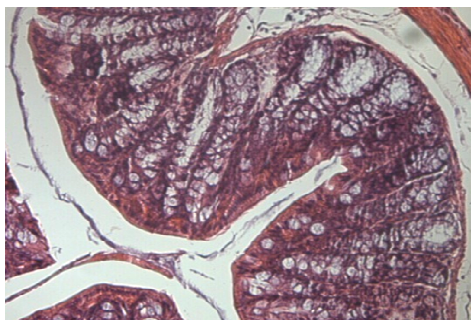
mediales Kolon

distales (rektal) Kolon

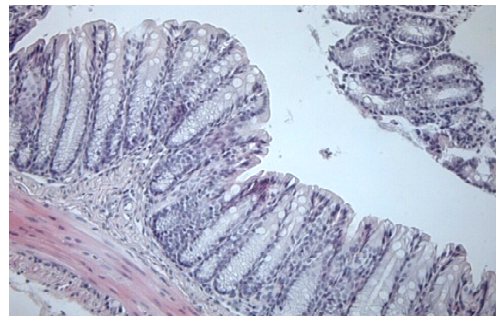
unbehandelte Kontrolle (200-fache Vergrößerung)



TNBS + physiologische Kochsalzlösung (200-fache Vergrößerung)



TNBS + XG102 (200-fache Vergrößerung)



TNBS + Sulfasalazin (200-fache Vergrößerung)

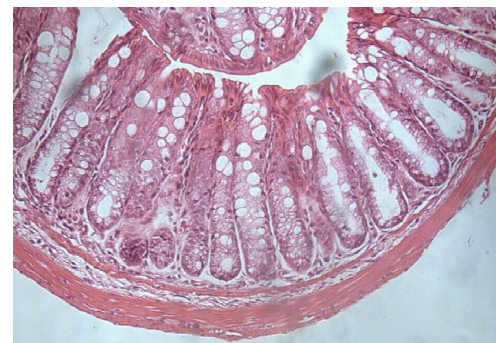
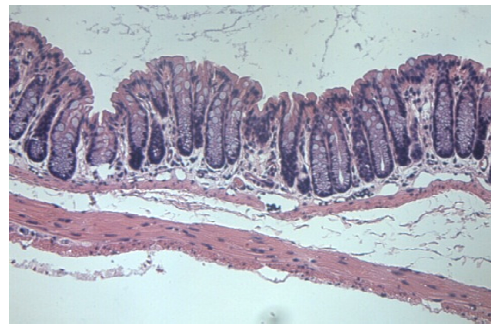


Abb.7: Krypten (repräsentative Abbildungen)

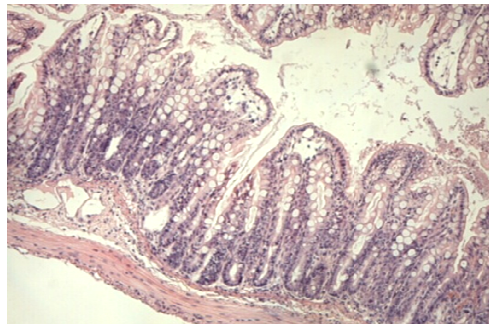
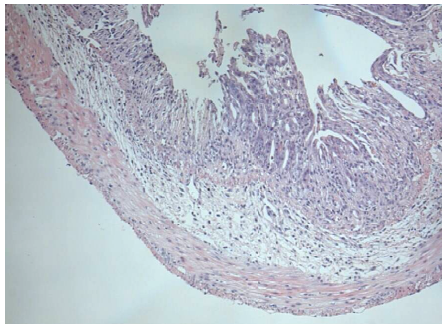
mediales Kolon

distales (rektal) Kolon

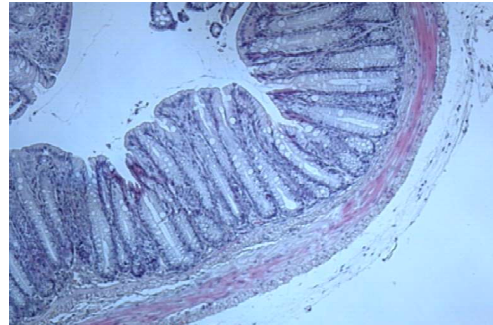
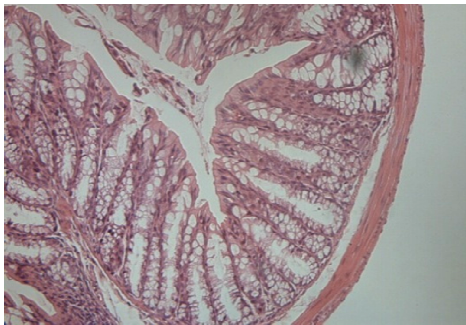
unbehandelte Kontrolle (200-fache Vergrößerung)



TNBS + physiologische Kochsalzlösung (200-fache Vergrößerung)



TNBS + XG102 (200-fache Vergrößerung)



TNBS + Sulfasalazin (200-fache Vergrößerung)

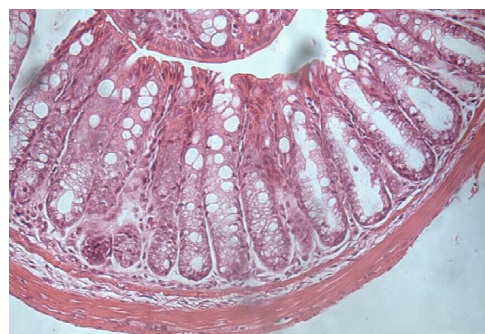
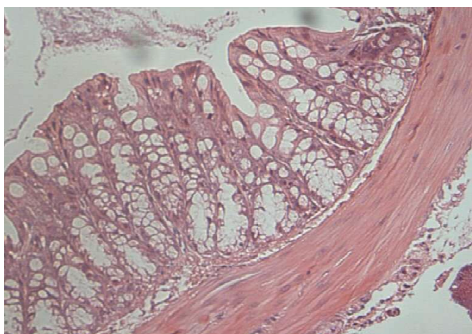
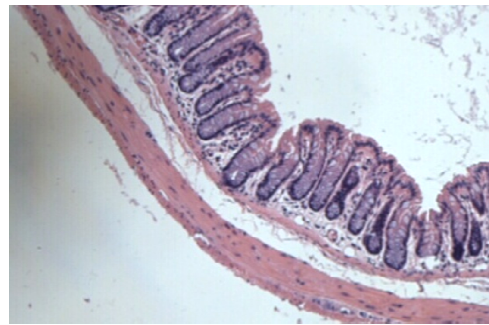
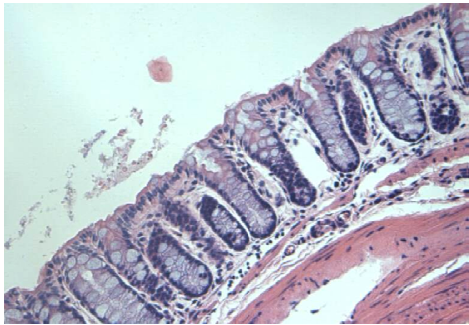


Abb.8: Submukosa (repräsentative Abbildungen)

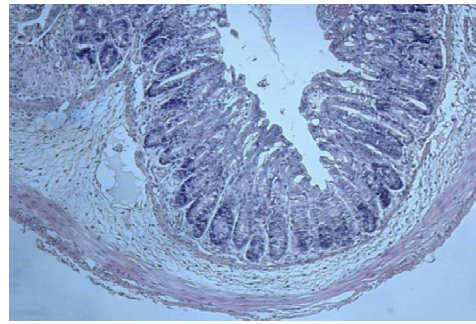
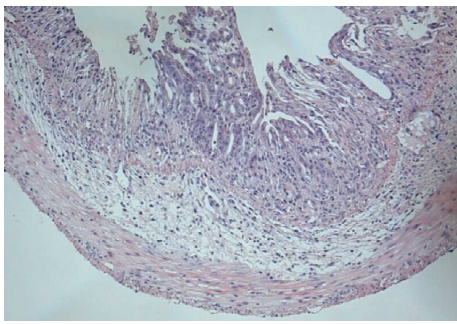
mediales Kolon

distales (rektal) Kolon

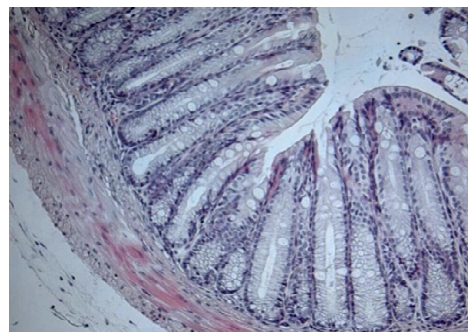
Unbehandelte Kontrolle (200-fache Vergrößerung)



TNBS + physiologische Kochsalzlösung (200-fache Vergrößerung)



TNBS + XG102 (200-fache Vergrößerung)



TNBS + Sulfasalazin (200-fache Vergrößerung)

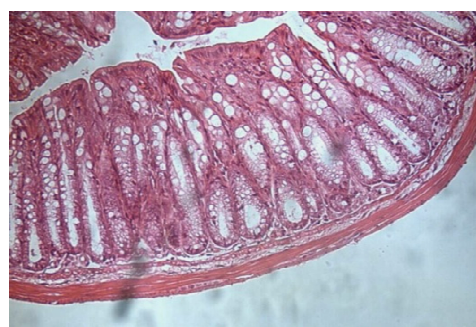
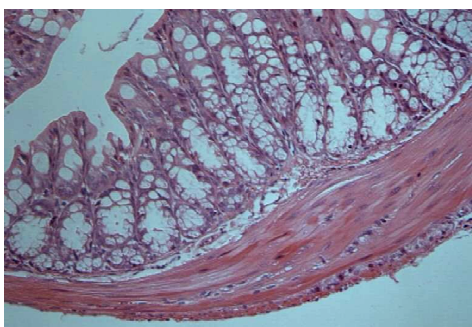
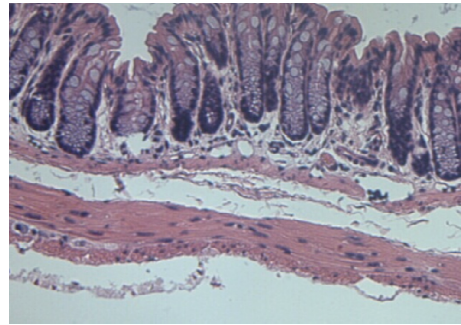
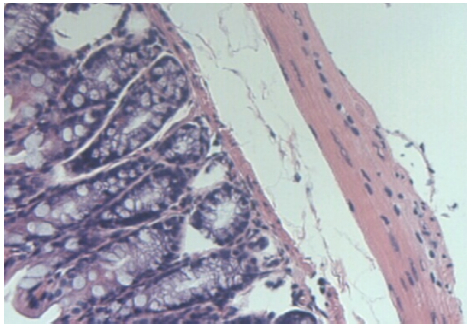


Abb.9: Infiltration (repräsentative Abbildungen)

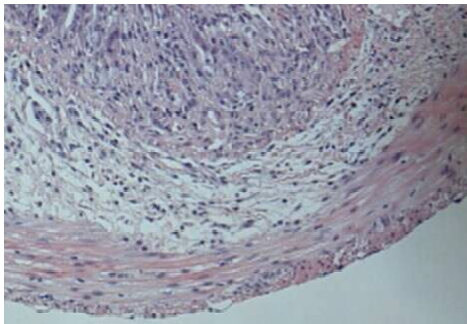
mediales Kolon

distales (rektal) Kolon

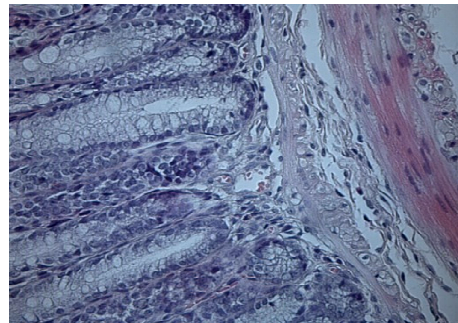
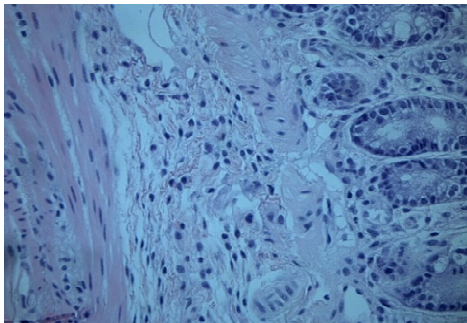
unbehandelte Kontrolle (200-fache Vergrößerung)



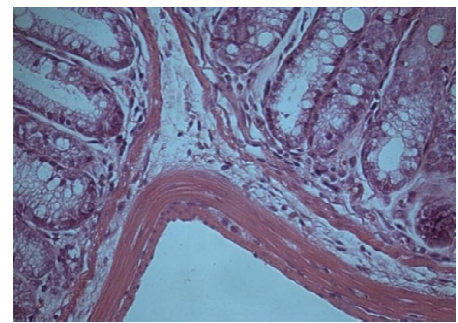
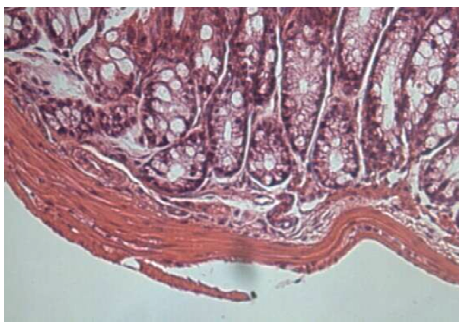
TNBS + physiologische Kochsalzlösung (400-fache Vergrößerung)



TNBS + XG102/XG10X (400-fache Vergrößerung)



TNBS + Sulfasalazin (400-fache Vergrößerung)



3.2 H + E Scoring

Wir hatten die Möglichkeit, die Wirkung des neuen JNK- Inhibitors XG102 und seines Derivates XG10X bei der Kolitis in der Maus zu untersuchen.

Durch die Analyse bereits durchgeführter Studien mit TNBS- Koliditen konnte ein geeigneter Versuchsrahmen für die Bewertung festgelegt werden. Bei allen vorgestellten Versuchen wurden weibliche, sieben Wochen alte BALB/C- Mäuse verwendet, welche unter gleichen Bedingungen gehalten wurden. Da es sich bei XG102 um einen neuen Inhibitor handelt, wurden verschiedene Applikationswege (subkutan, intravenös und peroral) und unterschiedliche Applikationszeiträume gewählt. Dabei wurde ebenfalls die Konzentration von XG102 bzw. XG10X variiert, während die TNBS- Lösung stets dieselbe Zusammensetzung behielt.

Folgende Applikationen wurden durchgeführt:

XG102	s.c.
XG102	s.c. vor TNBS-Applikation
XG102	i.v.
XG102	p.o.
XG10X	s.c.

Eine Übersicht über die durchgeführten Versuchsreihen und die jeweilige Versuchsdauer gibt Tabelle 5.

Kontrolltiere

Zur objektiven Betrachtung der H+E – Färbungen wurden einmalig fünf Mäuse, welche vorher weder mit TNBS noch mit Medikamenten behandelt worden sind, getötet und deren Gewebe entnommen. Bei ihnen wurde eine normale H+E – Färbung durchgeführt und nach der Tabelle 4 bewertet. Obwohl diese Tiere vorher keine Behandlung erfahren haben, zeigten die Schnitte hin und wieder leichte Gewebeveränderungen wie z.B. leichte Kryptenreduktionen oder leichte Ulzerationen. Dies weist darauf hin, dass die Morphologie des Darms ebenfalls von äußeren Faktoren beeinflusst wird und auch im natürlichen Zustand z.T. entzündliche Reaktionen aufweist, was sich in der histologischen Bewertung mit dem Score 0,8 niederschlägt.

Tab. 5: Übersicht über die durchgeführten Versuchsreihen

<u>Set</u>	<u>Applikation</u>	<u>Dosierung XG</u>	<u>Vergleichsgruppe(n) *</u>	<u>Versuchsdauer</u>
XG102 1-3 s.c.	subkutan	XG102: 100 µg/kg	NaCl	7 Tage
XG102 4 s.c.	subkutan	XG102: 100 µg/kg XG102: 10 µg/kg	Sulfasalazin: 10 mg/kg NaCl	3 Tage
XG102/XG10X 5-6 s.c.	subkutan	XG102: 100 µg/kg XG10X: 50 µg/kg	Sulfasalazin: 10 mg/kg NaCl	3 Tage
XG102 p.e.	subkutan 48 und 24 Stunden vor Versuchsbeginn	XG102: 100 µg/kg	NaCl	3 Tage
XG102 i.v.	intravenös	XG102: 1µg/kg	PBS	3 Tage
XG102 1-3 p.o.	oral	XG102: 1 mg/kg XG102: 100 µg/kg	Sulfasalazin: 10 mg/kg NaCl	3 Tage

*einmalig unbehandelte Kontrollgruppe für alle Versuchsreihen

3.3 XG102

3.3.1 XG102 subkutan

3.3.1.1 XG102 subkutan Set 1-3

Die Versuche wurden wie in Abschnitt 2.3 erläutert durchgeführt und der klinische Score anhand von Tabelle 2 sowie der histologische Score anhand von Tabelle 4 bestimmt.

Der JNK-Inhibitor wurde vor der TNBS-Applikation subkutan in den Nacken der Tiere gespritzt. Dabei diente als Kontrolle physiologische Kochsalzlösung (NaCl), die ebenfalls vor der TNBS-Applikation subkutan in den Nacken der Kontrolltiere verabreicht wurde. Die Konzentration des JNK-Inhibitor XG102 entsprach 100 µg/kg, da bei dieser maximalen Konzentration ein Ergebnis zu erwarten war.

Die Tiere wurden in den darauf folgenden sieben Tagen, wobei Tag 0 den Tag der Applikation darstellt, täglich begutachtet, gewogen und auf Blut im Stuhl untersucht.

Am Tag 7 wurden die Tiere getötet, das Gewebe entnommen und mittels H + E- Färbung bewertet.

Der Blick auf die histologischen Daten zeigt, dass hinsichtlich der Parameter Ulcera, Krypten und Inflammation sowohl im medialen als auch im distalen Kolon keine signifikante Veränderung zwischen den mit XG102 behandelten Tieren und der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe besteht. Während des Versuchs wurde regelmäßig der DAI (Tab.2) bestimmt, der die Parameter einer Kolitis wie Gewichtsverlust, Stuhlkonsistenz und rektale Blutungen sowie die Schwere der Kolitis abbildet, d.h. nach sieben Tagen in dieser Versuchsanordnung.

Das ganze Ausmaß der erzeugten Kolitis wird in der Histologie sichtbar, in der die Parameter Ulzerationen, Krypten und Inflammationen die Stärke der Gewebeschädigung widerspiegeln.

Um einen Zusammenhang zwischen den beiden Parametern DAI und H + E- Färbung herzustellen, wurden die erhobenen Daten in Diagrammen zusammengefasst.

In Abb.11 ist die Korrelation der histologischen Änderung gegen den DAI aufgetragen.

Der DAI der Tiere, die XG102 in der Dosierung 100µg/kg erhalten hatten, ist insgesamt niedriger als derjenige der Tiere, die Kochsalz erhielten. Der DAI nimmt mit zunehmender Versuchsdauer ab. Dabei sinken auch die DAI der Tiere, die nur Kochsalz erhalten haben.

In der Untersuchung des Gewichtsverlustes zeigen sich ähnliche Beobachtungen, d.h. die Tiere, die XG102 erhalten haben, weisen einen geringeren Gewichtsverlust auf, der bis zu einer Gewichtszunahme im Verlauf des Versuches reicht.

Abb.10: Histologische Änderung von XG102 Set 1-3; Mittelwerte der Summen von Ulzeration, Krypten und Infiltration pro Tier der Tabelle 5. Das Histogramm präsentiert die Kolonhistologie am Tag 7 nach TNBS- Gabe sowie Kochsalz- und XG102-Applikation.

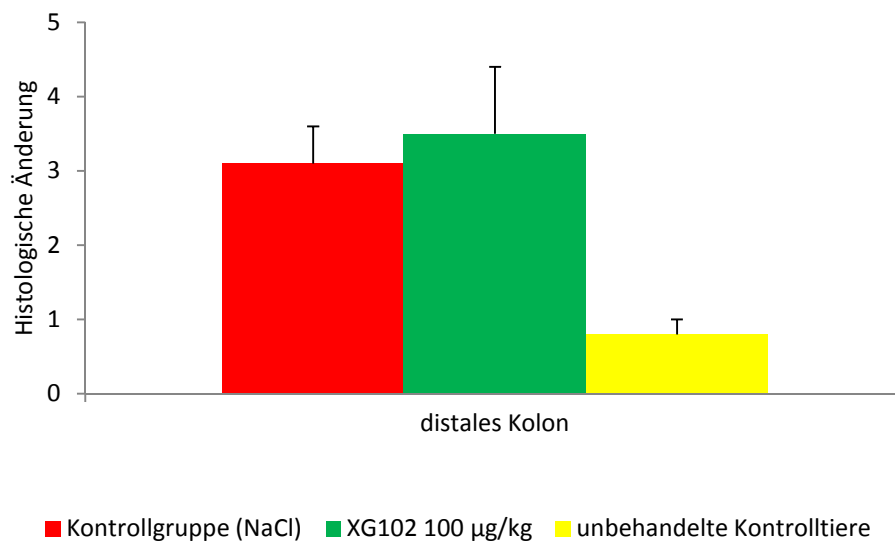
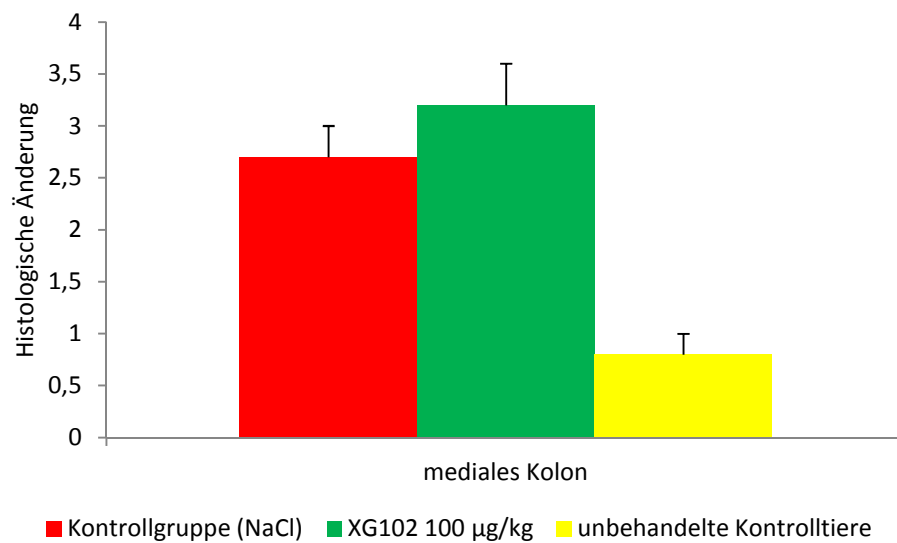


Tabelle 6: Histologische Daten von XG102 subkutan Set 1-3

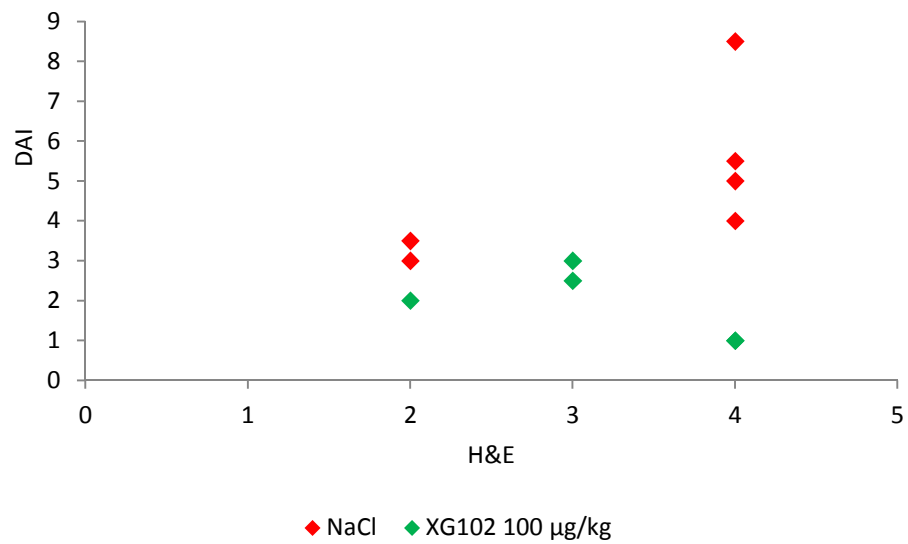
Die histologische Änderung entspricht dem Mittelwert der einzelnen histologischen Werte. Diese stellt die Addition aus Krypten, Ulzeration und Infiltration dar. Die histologische Änderung wird in Abbildung 10 grafisch dargestellt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mittels Anova ermittelt.

N= Anzahl der für diese Versuchsgruppe eingesetzten Tiere

Mediales Kolon	NaCl (N=7)	XG102 100µg/kg (N=5)	Unbehandelte Kontrolle (N=5)
I) Ulzeration	1,6±0,2	1,8±0,2	0±0
II) Krypten	1,1±0,1	1,4±0,2	0,4±0,2
III) Infiltration	0±0	0±0	0,4±0,2
Summe der Mittelwerte ± Standardfehler	2,7±0,3	3,2±0,4	0,8±0,2
Distales Kolon	NaCl (N=7)	XG102 100µg/kg (N=5)	Unbehandelte Kontrolle (N=5)
I) Ulcera	1,6±0,2	1,5±0,2	0±0
II) Krypten	1,0±0,0	1,3±0,3	0,6±0,2
III) Infiltration	0,6±0,2	0,8±0,5	0,2±0,2
Summe der Mittelwerte ± Standardfehler	3,1±0,3	3,5±0,9	0,8±0,2

Abb.11: Die Korrelation der histologischen Änderung (Summe der Mittelwerte) gegen den Disease-Activity-Index für jedes Tier der Gruppe XG102 und der mit Kochsalz (NaCl) behandelten Gruppe im medialen und distalen Kolon.

Mediales Kolon



Distales Kolon

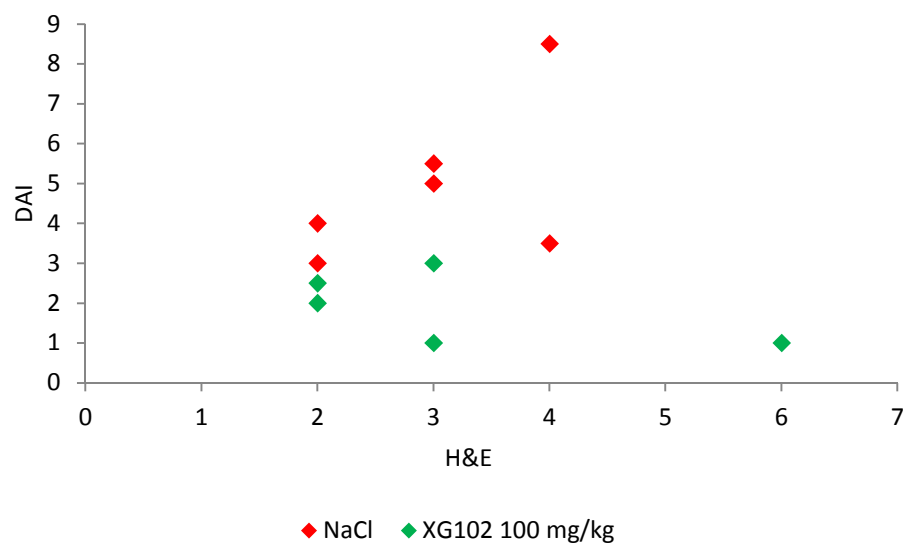
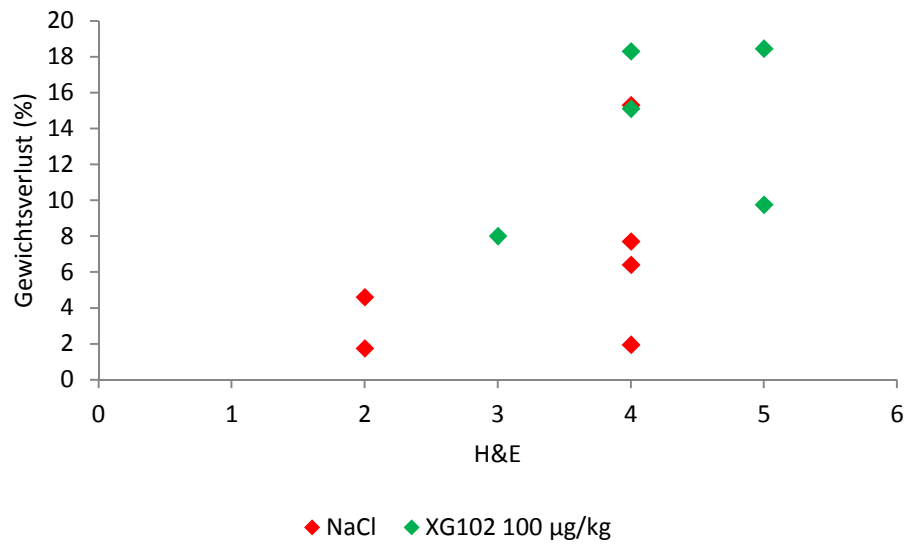
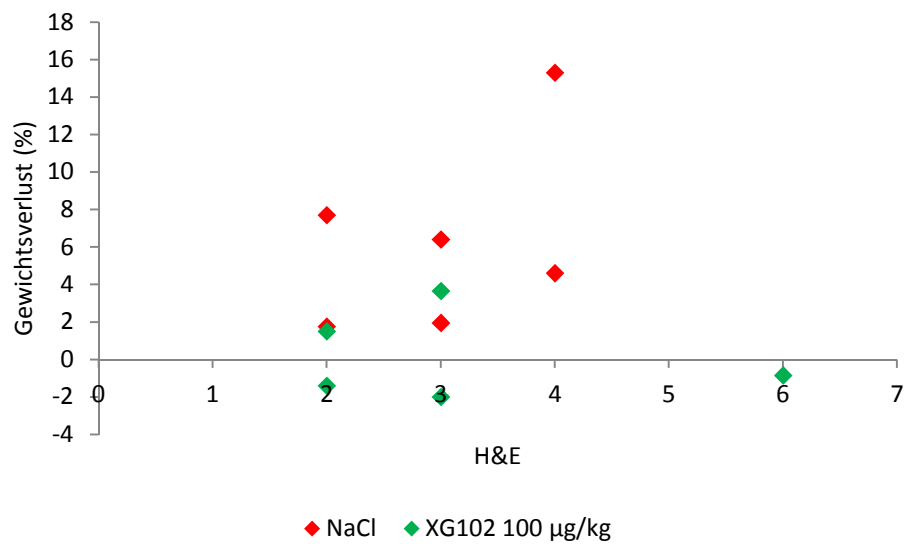


Abb.12: Die Korrelation der histologischen Änderung (Summe der Mittelwerte) gegen den Gewichtsverlust (%) für jedes Tier der Gruppe XG102 und der mit Kochsalz behandelten Gruppe.

Mediales Kolon



Distales Kolon



3.3.1.2 XG102 subkutan Set 4

Nach Auswertung der durch die Arbeitsgruppe durchgeführten Vorversuche zeigte sich, dass sich sowohl der DAI als auch der Gewichtsverlust nur bis zum dritten Versuchstag signifikant änderten und in den weiteren Tagen auf diesem Niveau verblieben. Die größten histologischen Änderungen konnten bis zum dritten Tag nachgewiesen werden. Aus diesen Tatsachen wurde der Schluss gezogen, dass die akute Kolitis nur in den ersten drei Tagen deutlich ausgeprägt ist und sich der Darm bei längerer Versuchsdauer bereits wieder regeneriert. Daher wurde die folgende Versuchsreihe erstmals dahingehend geändert, dass bereits am dritten Tag nach TNBS-Applikation der Versuch beendet und das Gewebe entnommen wurde.

Zusätzlich wurde hier neben der NaCl-Vergleichsgruppe und den XG102-Gruppen (in verschiedenen Dosierungen) auch eine Testung mit Sulfasalazin durchgeführt, um einen Vergleich mit der Standardtherapie zu ermöglichen. Hierbei handelt es sich um die Verbindung eines Sulfonamids (Sulfapyridin) mit 5-Aminosalicylsäure (Mesalazin), welches besonders die Bildung von Zytokinen hemmt.

Die Kolitis ist im distalen Kolon stärker ausgeprägt als im medialen Kolon, was wahrscheinlich auf die rektale Applikation zurückzuführen ist (siehe auch Set 1-3).

Die Gruppe, der nur physiologische Kochsalzlösung (NaCl) verabreicht wurde, zeigt die höchsten histologischen Änderungen (Tab.6).

Die mit Sulfasalazin behandelten Tiere zeigen durch die antiinflammatorische Wirkung des Sulfasalazins einen besonders geringen Anteil an Immunzellen (Tab.6, III).

Bei den Tieren, die XG102 erhielten, konnten die Infiltrationen im distalen Kolon um mehr als 30% durch den JNK-Inhibitor abgeschwächt werden. Die Infiltration verläuft hier signifikant milder als bei der mit Kochsalz behandelten Gruppe und um 50% geringer als bei den mit Sulfasalazin behandelten Tieren. Die Ulzerationen verringern sich ebenfalls im medialen Kolon sowohl für beide XG-Gruppen als auch für die Sulfasalazin-Gruppe signifikant um die Hälfte (Tab.6). Die Gabe von XG102 in den Konzentrationen 10 µg/kg und 100 µg/kg reduziert im distalen Kolon die Zerstörung der Kryptenstruktur ebenfalls signifikant um die Hälfte. Insgesamt ist die histologische Änderung (Summe der Mittelwerte aller histologischen Parameter) im distalen Kolon für die Tiere, die XG102 in der Dosierung 10 µg/kg und für die Tiere, die XG102 in der Dosierung 100 µg/kg erhielten, signifikant verringert (Tab.6).

In der Gegenüberstellung von DAI und der histologischen Änderung in H + E- Färbung

(Abb. 14) zeigt sich, dass die Tiere, die XG102 erhalten hatten, eine deutlich geringere histologische Änderung aufweisen, in Kombination mit einem niedrigen DAI, der zwischen 2 und 4 angesiedelt ist. Weiterhin lässt sich erkennen, dass die mit Kochsalz behandelten Tiere sowohl einen höheren Score in der histologischen Bewertung aufwiesen, als auch einen deutlich erhöhten DAI. Hier kann erstmals ein Zusammenhang zwischen den Parametern DAI und H +E- Färbung nachgewiesen werden, d.h. ein hoher Score in der histologischen Bewertung geht an dieser Stelle mit einem erhöhten DAI einher.

Im distalen Kolon (Abb. 14) weist die XG102- Gruppe, die 100 µg/kg erhalten hatte, insgesamt geringere histologische Werte sowie einen geringen DAI auf. Die mit Sulfasalazin behandelten Tiere wiesen allgemein einen erhöhten histologischen Score auf bei sehr unterschiedlichen DAI.

Hier lässt sich kein Zusammenhang nachweisen, ebenso wenig für die mit Kochsalz behandelten Tiere, die zwar einen deutlich erhöhten histologischen Score aufwiesen mit Veränderungen, aber einen sehr unterschiedlichen DAI zeigten.

Im Vergleich von Gewichtsverlust und H + E- Färbung (Abb. 15) weisen die mit XG102 behandelten Tiere sowohl einen niedrigeren histologischen Score als auch einen geringeren Gewichtsverlust auf, während die Tiere, die physiologische Kochsalzlösung bekamen, für beide Parameter höhere Werte aufweisen, d.h. ein erhöhter histologischer Score ging mit erhöhtem Gewichtsverlust einher. Die Sulfasalazin – Gruppe wies ebenfalls bei niedrigem H+ E –Score einen geringen Gewichtsverlust auf.

Im distalen Kolon (Abb. 15) kann für die XG102- Gruppe in der 100 µg/kg – Dosierung eine Korrelation zwischen Gewichtsverlust und histologischer Änderung nachgewiesen werden. Die Tiere, die einen geringen histologischen Score in der H+ E- Färbung aufweisen, zeigen auch einen niedrigen Gewichtsverlust, während ein erhöhter histologischer Score auch mit einem erhöhten Gewichtsverlust verbunden ist. Die mit Kochsalz behandelten Tiere weisen auch im distalen Kolon sowohl einen erhöhten H + E –Score auf, als auch einen deutlichen Gewichtsverlust, der bis zu 20 % beträgt.

Die Sulfasalazin –Gruppe zeigt einen konstanten Wert im histologischen Score, während der Gewichtsverlust erhöht ist.

Abb.13: Histologische Änderung von XG102 Set 4; Mittelwerte der Summen von Ulzeration, Krypten und Infiltration pro Tier der Tabelle 6. Das Histogramm präsentiert die Kolonhistologie am Tag 3 nach TNBS- Gabe, Kochsalz-, XG102- und Sulfasalazin-Applikation sowie die unbehandelten Kontrolltiere.

Signifikanzen: * $p = < 0,05$; ** $p = < 0,01$

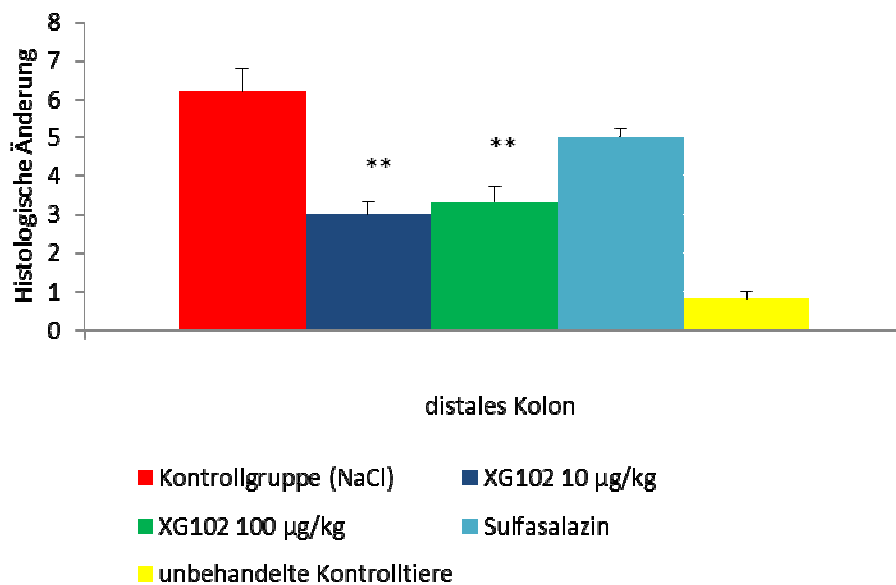
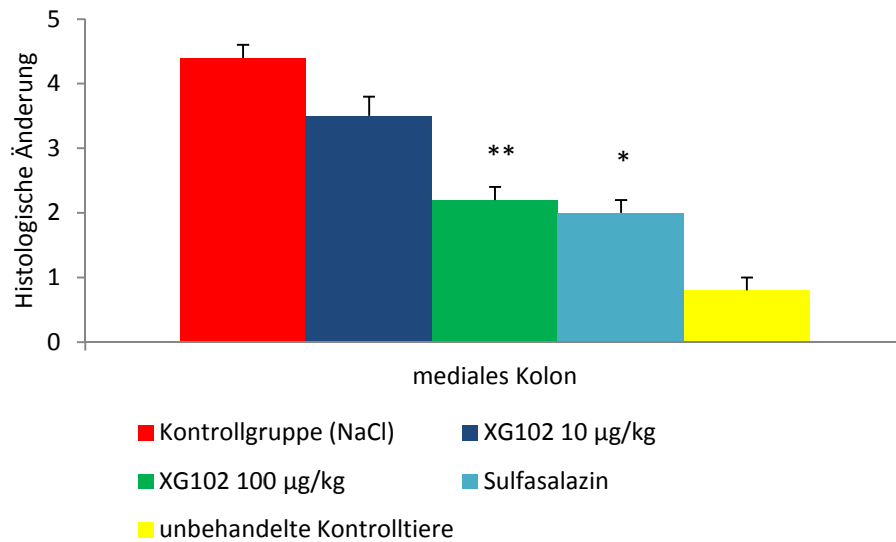


Tabelle 7: Histologische Daten von XG102 sc 4

Die histologische Änderung entspricht dem Mittelwert der einzelnen histologischen Werte. Diese stellt eine Addition aus Krypten, Ulzeration und Infiltration dar. Die histologische Änderung wird in Abb.13 grafisch dargestellt.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mittels Anova ermittelt. Ebenso die Signifikanzen: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$;

N=Anzahl der für diese Versuchsgruppe eingesetzten Tiere

Mediales Kolon	NaCl (N=5)	XG102 10 µg/kg (N=2)	XG102 100µg/kg (N=6)	Sulfasalazin (N=4)	Unbehandelte Kontrolle (N=5)
I) Ulzeration	2±0	1,5±0,5*	1,0±0**	1,0±0**	0±0
II) Krypten	1,4±0,2	1,5±0,5	1,0±0	1,0±0	0,4±0,2
III) Infiltration	1,0±0,3	0,5±0,5	0,2±0,2	0±0	0,4±0,2
Summe der Mittelwerte ± Standardfehler	4,4±0,2	3,5±5	2,2±0,2**	2,0±0,2*	0,8±0,2
Distales Kolon	NaCl (N=5)	XG102 10 µg/kg (N=2)	XG102 100µg/kg (N=6)	Sulfasalazin (N=4)	Unbehandelte Kontrolle (N=5)
I) Ulcera	2,4±0,2	1,5±0,5	1,5±0,2	2,0±0	0±0
II) Krypten	2,2±0,2	1,0±0*	1,3±0,2*	2,0±0	0,6±0,2
III) Infiltration	1,6±0,2	0,5±0,5	0,5±0,2	1,0±0	0,2±0,2
Summe der Mittelwerte ± Standardfehler	6,2±0,6	3,0±0,3**	3,3±0,4**	5,0±0,2	0,8±0,2

Abb.14: Die Korrelation der histologischen Änderung (Summe der Mittelwerte) gegen den Disease-Activity-Index für jedes Tier der Gruppe XG102 und der mit Kochsalz behandelten Gruppe sowie der Sulfasalazin-Gruppe im medialen und distalen Kolon.

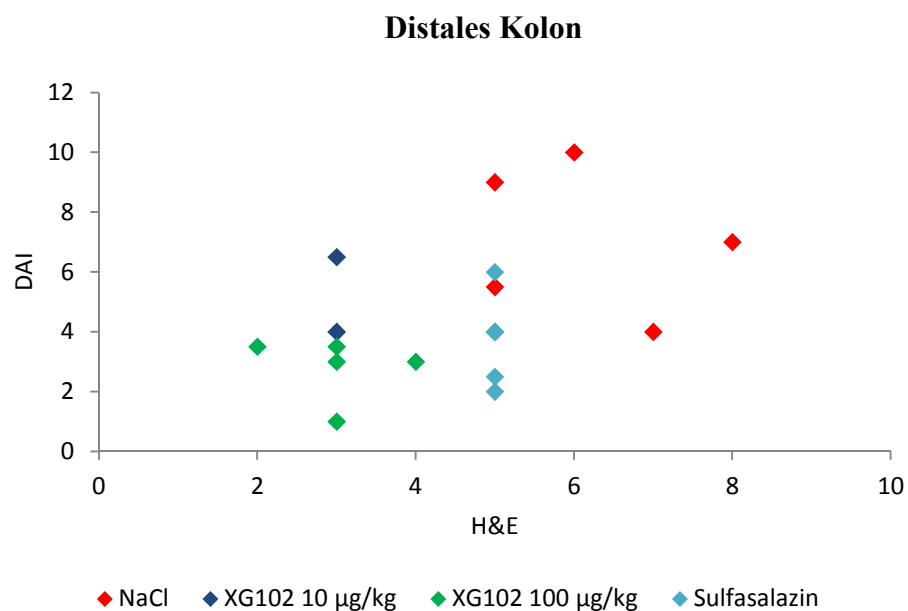
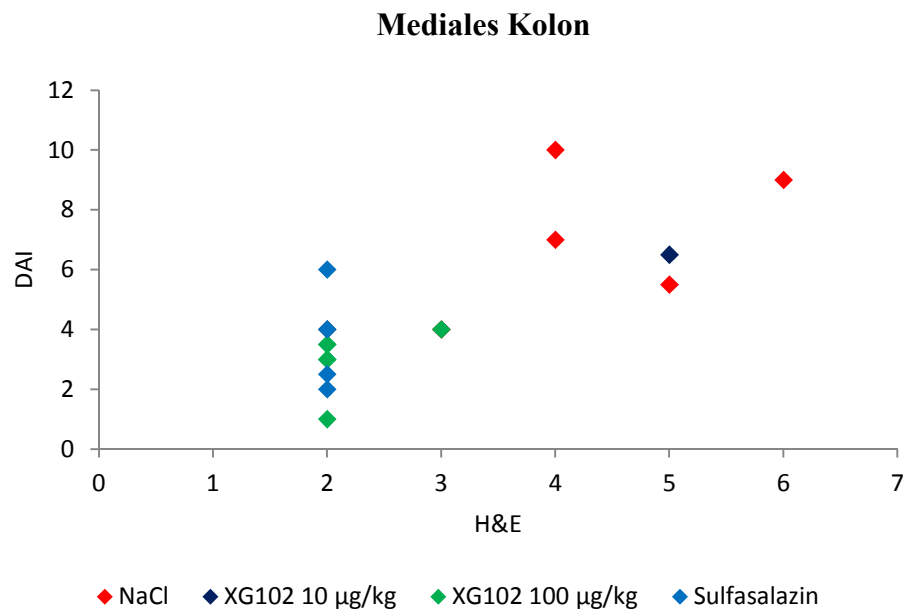
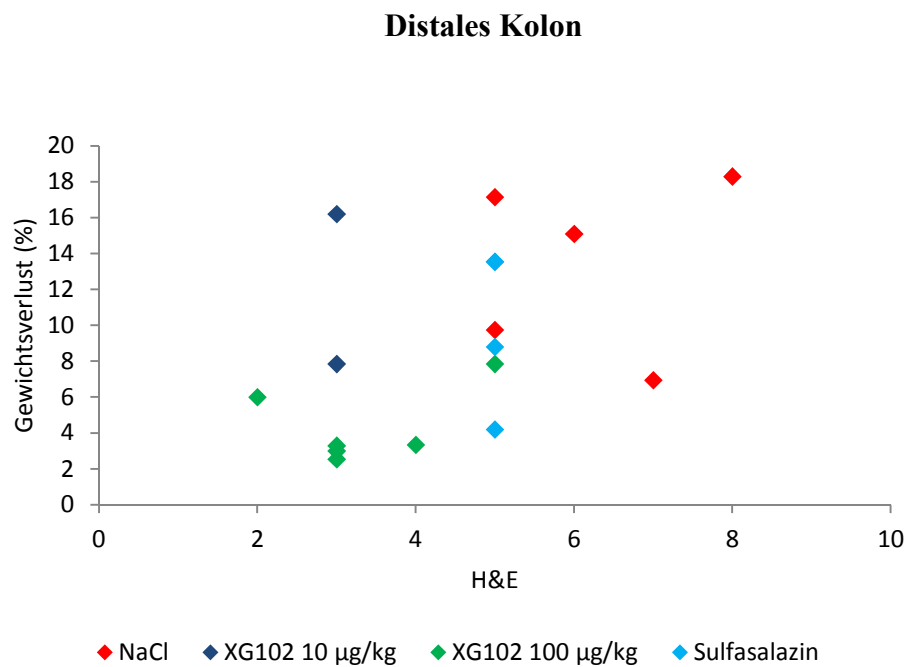
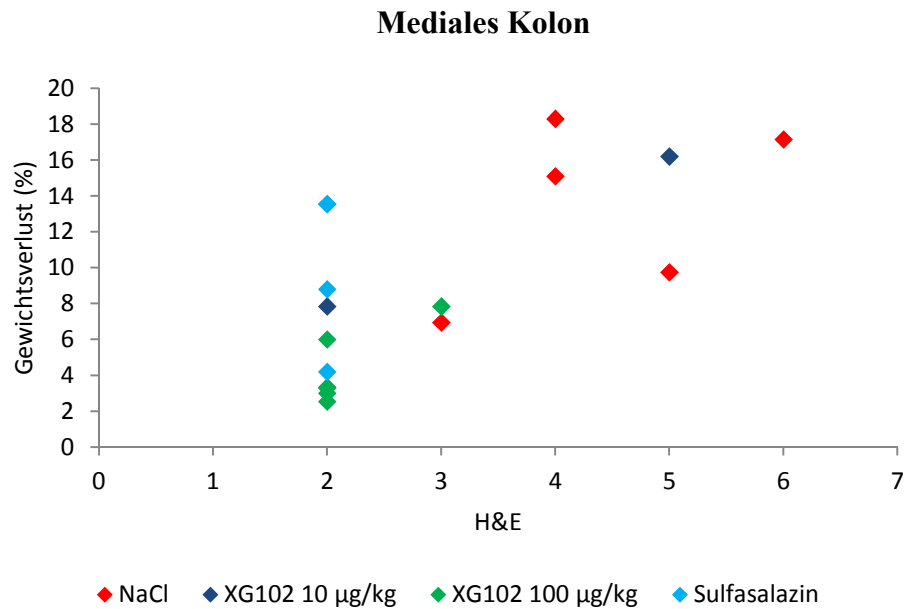


Abb.15: Die Korrelation der histologischen Änderung (Summe der Mittelwerte) gegen den Gewichtsverlust (%) für jedes Tier der Gruppe XG102, der Kochsalz-Gruppe und der Sulfasalazin-Gruppe



3.3.1.3 XG102/XG10X subkutan Set 5-6

Der Inhibitor XG102 konnte bereits seine Wirkung in der Kolitis unter Beweis stellen, wie die auf den vorigen Seiten dargestellten Ergebnisse zeigen. Bei seinem Derivat XG10X wird ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf die JNK-Signalkaskade geprüft.

Es unterscheidet sich von XG102 besonders durch die kürzere Halbwertszeit.

Um eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen, wurden die beiden Wirkstoffe in derselben Versuchsreihe verwendet. Als Vergleichsgruppen dienten wiederum Tiere, die physiologische Kochsalzlösung erhielten und Tiere, denen Sulfasalazin verabreicht wurde, um zugleich einen Vergleich mit der Standardtherapie zu ermöglichen.

Die Tiere wurden wie im Vorversuch bereits an Tag 3 nach Versuchsbeginn getötet und das Gewebe entnommen, da so eine stärkere Form der Kolitis zu erwarten war.

Die XG102-Gruppe erhielt eine Dosierung von 100 µg/kg, während die XG10X-Gruppe eine Dosierung in Höhe von 50 µg/kg verabreicht bekam.

Vor allem in der histologischen Änderung zeigte sowohl XG102 als auch sein Derivat XG10X signifikant geringere Ulzerationen, einen Erhalt der Kryptenstruktur und verringerte Infiltrationen (Tab.7). Diese Wirkung war vor allem im medialen Kolon zu beobachten. Im Vergleich zu Sulfasalazin als Standardtherapie-Gruppe konnte XG10X signifikant die Anzahl und Schwere der Ulzerationen senken (Tab.7).

Auch im distalen Kolon konnten positive Effekte der Inhibitoren XG102 und XG10X nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein signifikant besserer Erhalt der Kryptenstruktur im Vergleich zu den mit Kochsalz behandelten Tieren. XG10X zeigte im distalen Kolon eine besondere Wirksamkeit in der Reduktion von Infiltrationen, nicht nur verglichen mit der Gruppe, die physiologische Kochsalzlösung verabreicht bekam, sondern auch mit den Tieren, die Sulfasalazin erhielten, das bereits in den zuvor beschriebenen Versuchsreihen seine antientzündliche Wirkung unter Beweis stellte.

Das klinische Bild (Abb. 17) zeigt für die mit XG10X und die mit XG102 behandelten Tiere einen Zusammenhang zwischen dem histologischen Score und dem DAI. Ein geringer Score in der histologischen Änderung korreliert hier mit niedrigen DAI- Werten.

Die Sulfasalazin- Gruppe weist erhöhte Werte in der histologischen Bewertung auf, bei relativ geringen DAIs, während die mit physiologischer Kochsalzlösung behandelte Gruppe erhöhte histologische Werte sowie die höchsten DAIs aller Versuchsgruppen aufweist.

Im distalen Kolon (Abb. 17) kann allgemein für die Werte aller untersuchten Gruppen ein Zusammenhang zwischen der H + E- Färbung und dem DAI festgestellt werden. Auffällig ist

auch hier, dass die mit XG102 sowie die mit XG10X behandelten Tiere sowohl einen niedrigeren histologischen Score als auch einen geringeren DAI aufweisen als die mit Kochsalz oder Sulfasalazin behandelten Tiere.

In der Betrachtung der histologischen Änderung gegen den Gewichtsverlust (Abb. 18) im medialen Kolon lassen sich die oben beschriebenen signifikant geringeren Werte für die XG-Gruppen ebenfalls nachweisen, ebenso eine Korrelation der Parameter histologischer Score und Gewichtsverlust für Tiere der Gruppe XG10X in der Dosierung 50 µg/kg. Tiere, die Sulfasalazin erhielten, weisen einen erhöhten histologischen Score auf, jedoch fast keinen Gewichtsverlust bis hin zur Gewichtszunahme, sogar bei sehr hoher histologischer Änderung. Die mit physiologischer Kochsalzlösung behandelte Gruppe wies sowohl die höchsten histologischen Änderungen als auch den größten Gewichtsverlust auf. Hier zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem höchsten histologischen Score und einem Gewichtsverlust von bis zu 15 %.

Im distalen Kolon (Abb. 18) lassen sich ähnliche Beobachtungen machen, d.h. die mit XG102 und mit XG10X behandelten Tiere weisen einen geringen Gewichtsverlust auf bei tendenziell niedrigem histologischen Score. Die Sulfasalazin –Gruppe weist einen signifikant niedrigen Gewichtsverlust auf bei relativ erhöhtem histologischen Score.

Wiederum weist die mit physiologischer Kochsalzlösung behandelte Gruppe einen Gewichtsverlust bis zu 15 % auf.

Abb.16: Histologische Änderung von XG102 und XG10X Set 5 und 6; Mittelwerte der Summen von Ulzeration, Krypten und Infiltration pro Tier der Tabelle 9. Das Histogramm präsentiert die Kolonhistologie an Tag 3 nach TNBS- und XG102/XG10X-Applikation. Signifikanzen: ** $p = < 0,01$

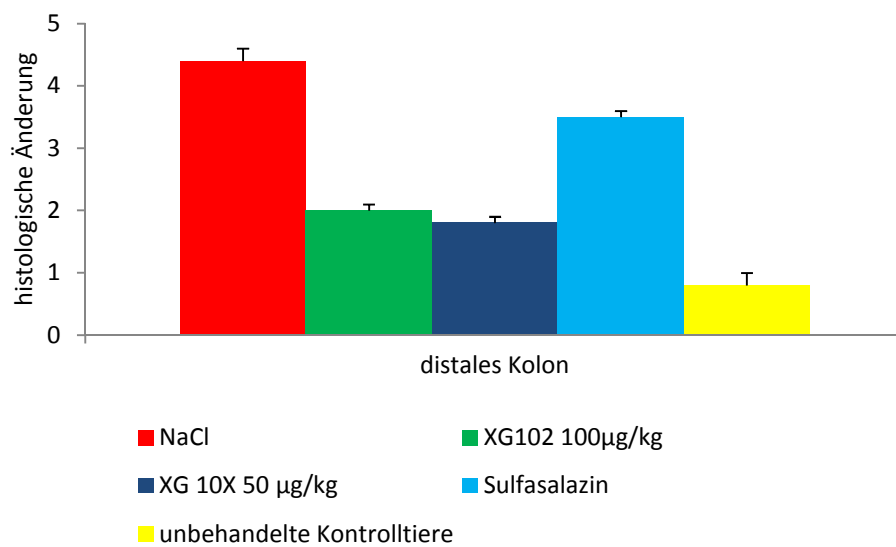
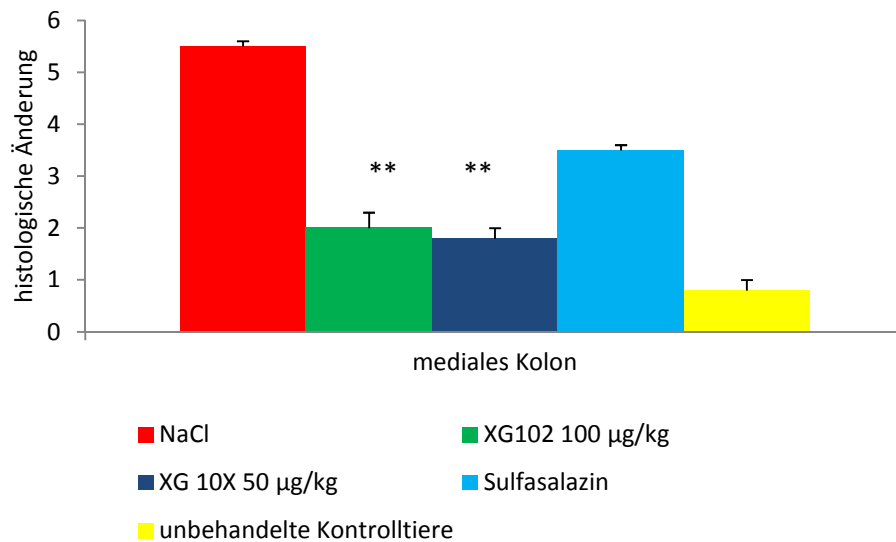


Tabelle 8: Histologische Daten von XG102/XG10X Set 5-6

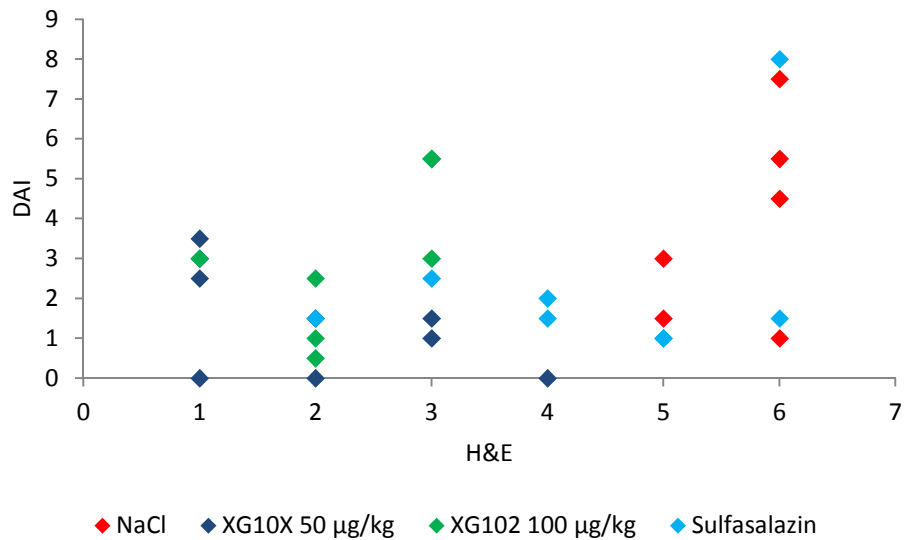
Die histologische Änderung entspricht dem Mittelwert der einzelnen histologischen Werte. Diese stellt die Addition aus Krypten, Ulzeration und Infiltration dar. Die histologische Änderung (Summe der Mittelwerte) wird in Abb.16 grafisch dargestellt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mittels Anova ermittelt. Ebenso die Signifikanzen: *p<0,05; **p<0,01

N=Anzahl der für diese Versuchsgruppe eingesetzten Tiere

Mediales Kolon	NaCl (N=9)	XG102 100 µg/kg (N=4)	XG10X 50 µg/kg (N=8)	Sulfasalazin (N=6)	Unbehandelte Kontrolle (N=5)
I) Ulzeration	2±0	1,1±0,1	0,9±0,1**	1,7±0,2	0±0
II) Krypten	1,9±1,3	0,7±0,1**	0,5±0,3**	1,5±0,1	0,4±0,2
III) Infiltration	1,6±0,1	0,2±0,2**	0,4±0,2**	1,0±0,3	0,4±0,2
Summe der Mittelwerte ± Standardfehler	5,5±0,1	2,0±0,3**	1,8±0,2**	3,5±0,1	0,8±0,2
Distales Kolon	NaCl (N=5)	XG102 10 µg/kg (N=2)	XG102 100µg/kg (N=6)	Sulfasalazin (N=4)	Unbehandelte Kontrolle (N=5)
I) Ulcera	1,2±0,2	1,2±0,2	1,1±0,5	1,7±0,1	0±0
II) Krypten	1,7±0,2	1,0±0,2*	1,0±0,1*	1,5±0,1	0,6±0,2
III) Infiltration	1,5±0,1	1,0±0,2	0,4±0,2	1,3±0,1	0,2±0,2
Summe der Mittelwerte ± Standardfehler	4,4±0,2	3,2±0,1	2,5±0,1	4,5±0,1	0,8±0,2

Abb.17: Die Korrelation der histologischen Änderung (Summe der Mittelwerte) gegen den Disease-Activity-Index für jedes Tier der Gruppe XG102/XG10X, der Kochsalz-Gruppe und der Sulfasalazin-Gruppe

Mediales Kolon



Distales Kolon

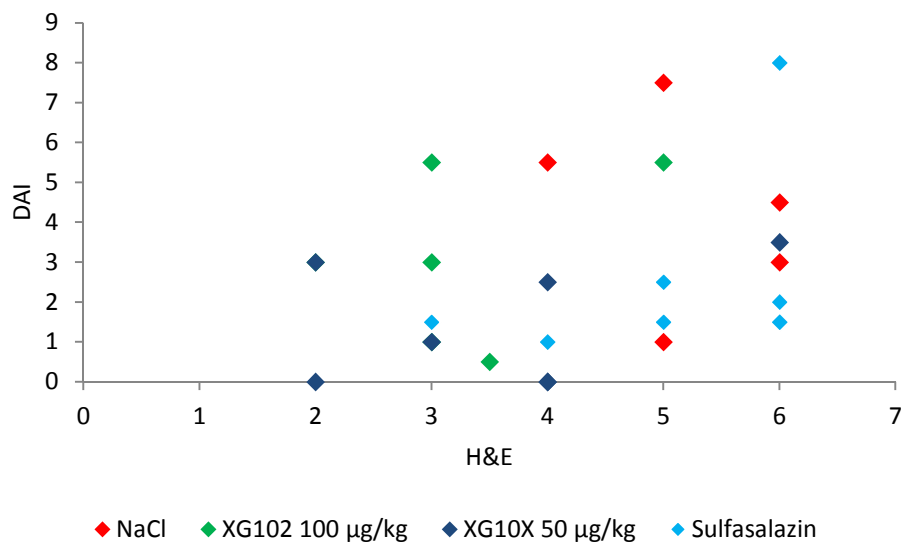
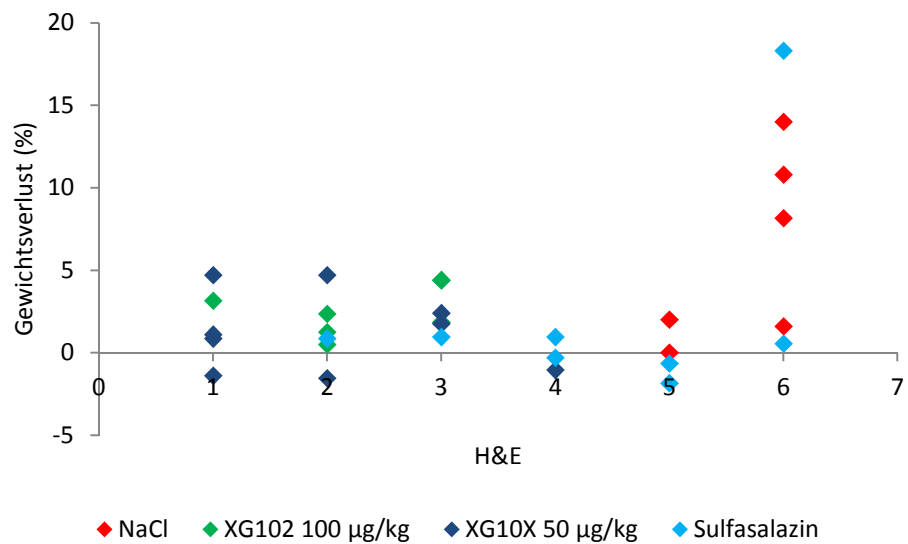
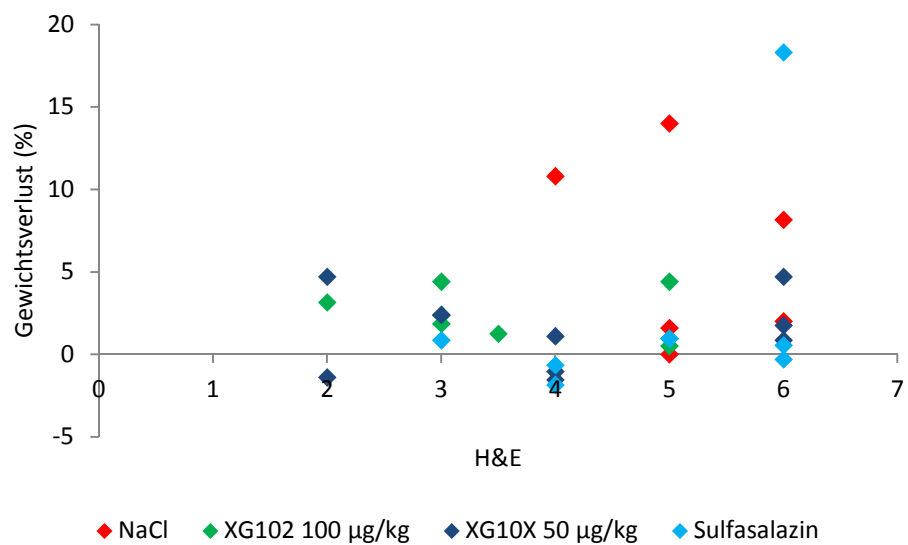


Abb.18: Die Korrelation der histologischen Änderung (Summe der Mittelwerte) gegen den Gewichtsverlust (%) für jedes Tier der Gruppe XG102/XG10X, der Kochsalz-Gruppe und der Sulfasalazin-Gruppe

Mediales Kolon



Distales Kolon



3.3.1.4 Subkutane Präexposition von XG102

Da in dem vorangegangenen Versuch XG102 sowohl im distalen als auch im medialen Kolon eine signifikante histologische Änderung und somit einen positiven Effekt auf die Kolitis gezeigt hat, wurde der Versuch unternommen, dies auch durch eine Verabreichung vor TNBS-Applikation zu erzielen.

Die maximale Konzentration von 100 µg/kg wurde sechs Tieren 48 Stunden vor der TNBS-Applikation subkutan gespritzt. Einer weiteren Gruppe wurde der Inhibitor 24 Stunden vor TNBS-Gabe appliziert. Nach der TNBS-Applikation wurden die Tiere drei Tage lang beobachtet.

In der H+E-Färbung konnte XG102 zwar keinen signifikanten Unterschied zeigen, jedoch war auch hier ein Trend zu verzeichnen. Im medialen Kolon bewirkte die Gabe von XG102 24 Stunden zuvor eine Reduktion des Gesamtscores um über die Hälfte (Tab.8). Im distalen Kolon waren die Ergebnisse weniger ausgeprägt, jedoch zeigte sich auch hier eine Reduktion der Inflammation. Besonders die Infiltrationen der beiden XG102-Gruppen sind schwach ausgeprägt.

Die Vergleichsgruppe, welche nur mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt wurde, zeigte besonders viele Immunzellen infolge der durch das TNBS ausgelösten Entzündungsreaktion. In beiden Kolonabschnitten ist die Gabe von XG102 24 Stunden zuvor wirksamer als die Gabe 48 Stunden zuvor (Abb.19).

Bei vorzeitiger Gabe von XG102 zeigt sich, dass die Tiere im Unterschied zur Vergleichsgruppe (physiologische Kochsalzlösung) einen geringeren DAI hatten, d.h. eine gute Stuhlkonsistenz, weniger Blut im Stuhl und einen geringeren Gewichtsverlust (Abb.20). Tiere, die einen Tag vor TNBS-Applikation XG102 gespritzt bekamen, wiesen sowohl einen niedrigen DAI als auch weniger histologische Änderungen auf. Im Gegensatz dazu zeigten Tiere, die den JNK-Inhibitor 48 Stunden zuvor bekamen, höhere DAI und eine durchschnittlich höhere Gewebeerstörung (Abb.20).

Im Hinblick auf den Zusammenhang zwischen der histologischen Änderung und dem DAI weisen die mit XG102 behandelten Tiere, bei denen eine Applikation 24 Stunden vor Versuchsbeginn durchgeführt wurde (d-1) sowohl einen geringen histologischen Score als auch einen relativ niedrigen DAI auf (Abb. 19).

Im distalen Kolon lässt sich kein Zusammenhang für die beiden Parameter feststellen, da hier in allen drei Versuchsgruppen sowohl Tiere mit einem niedrigen DAI und einem hohen histologischen Score als auch umgekehrt vorhanden sind.

Ebenso lässt sich die Korrelation der histologischen Änderung gegen den Gewichtsverlust im medialen Kolon beschreiben (Abb. 21). Auch hier liegt eine Streuung der Werte in allen drei Gruppen vor, sodass kein Zusammenhang zwischen histologischer Änderung und Gewichtsverlust beschrieben werden kann.

Im distalen Kolon hingegen besteht eine Korrelation zwischen dem histologischen Score und dem Gewichtsverlust (Abb. 21).

Hier zeigt sich deutlich, dass ein hoher histologischer Score mit hohem Gewichtsverlust einhergeht und umgekehrt.

Abb.19: Histologische Änderung von XG102 preexposition; Mittelwerte der Summen von Ulzeration, Krypten und Infiltration pro Tier der Tabelle 8. Das Histogramm präsentiert die Kolonhistologie an Tag 3 nach TNBS-Applikation. XG102 wurde einen Tag (24 Stunden; d-1) bzw. zwei Tage (48 Stunden; d-2) vor dem TNBS verabreicht. Signifikanzen: * $p = < 0,05$

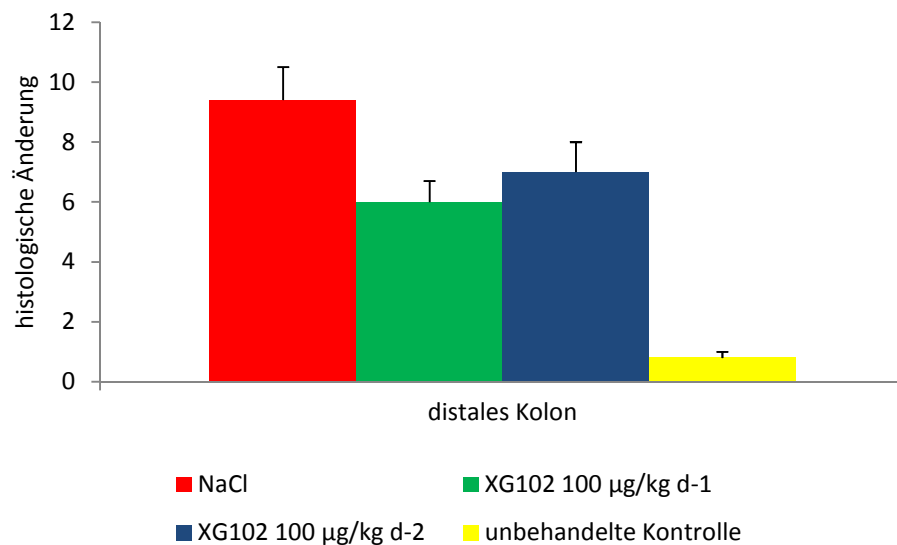
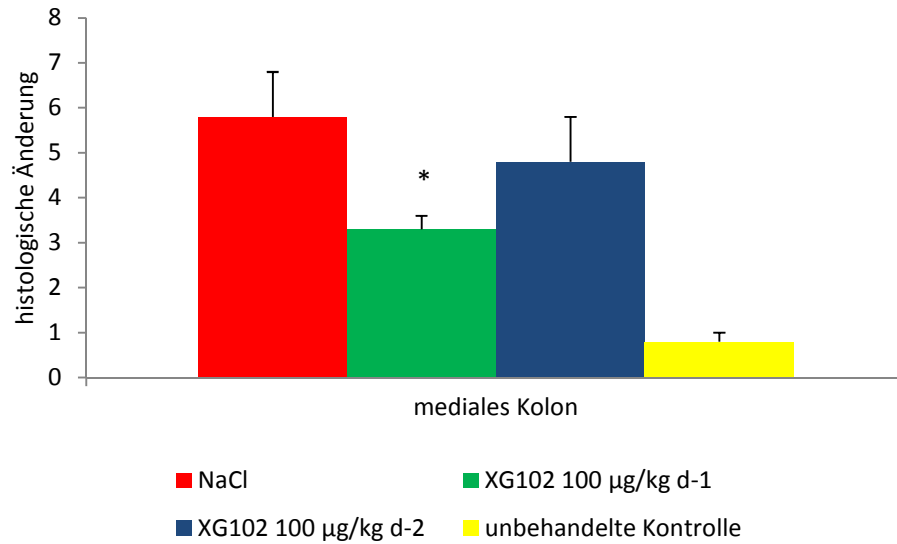


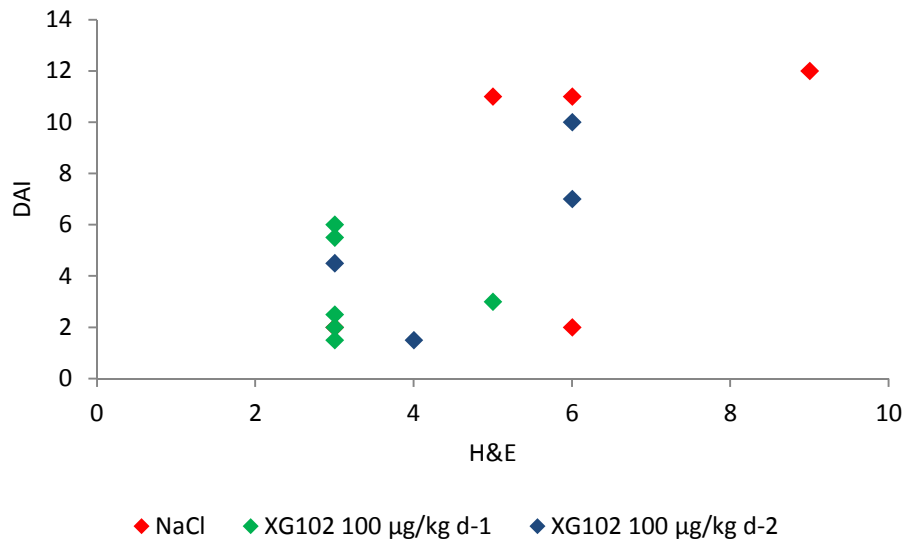
Tabelle 9: Histologische Daten von XG102 Präexposition

Die histologische Änderung entspricht dem Mittelwert der einzelnen histologischen Werte. Diese stellt eine Addition aus Krypten, Ulzeration und Infiltration dar. Die histologische Änderung wird in Abbildung 19 grafisch dargestellt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mittels Anova ermittelt. Ebenso die Signifikanzen: * $p < 0,05$; N=Anzahl der für die Versuchsgruppe eingesetzten Tiere

Mediales Kolon	NaCl (N=5)	XG102 100 µg/kg d-1 (N=4)	XG102 100 µg/kg d-2 (N=6)	Unbehandelte Kontrolle (N=5)
I) Ulzeration	2,0±0,3	1,1±0,2*	1,8±0,3	0±0
II) Krypten	2,0±0,3	1,2±0,2	1,5±0,3	0,4±0,2
III) Infiltration	1,8±0,4	1,0±0	1,5±0,3	0,4±0,2
Summe der Mittelwerte ± Standardfehler	5,8±1,0	3,3±0,3*	4,8±0,8	0,8±0,2
Distales Kolon	NaCl (N=5)	XG102 100 µg/kg d-1 (N=4)	XG102 100µg/kg d-2 (N=6)	Unbehandelte Kontrolle (N=5)
I) Ulcera	2,4±0,2	1,8±0,2	2,0±0,4	0±0
II) Krypten	2,4±0,2	1,8±0,2	2,0±0,4	0,6±0,2
III) Infiltration	2,2±0,2	1,3±0,2*	1,8±0,5	0,2±0,2
IV) Submukosa	2,2± 0,4	1,5±0,5	2,5±0,8	
Summe der Mittelwerte ± Standardfehler	9,4±1,1	6,0±0,7	7,0±1,0	0,8±0,2

Abb.20: Die Korrelation der histologischen Änderung (Summe der Mittelwerte) gegen den Disease-Activity-Index für jedes Tier der Gruppe XG102 d-1/d-2 und der Kochsalz-Gruppe

Mediales Kolon



Distales Kolon

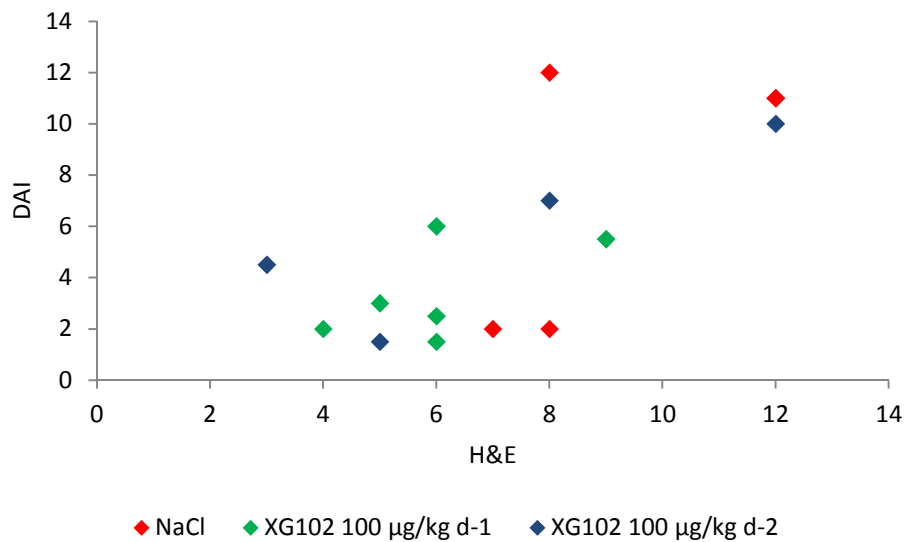
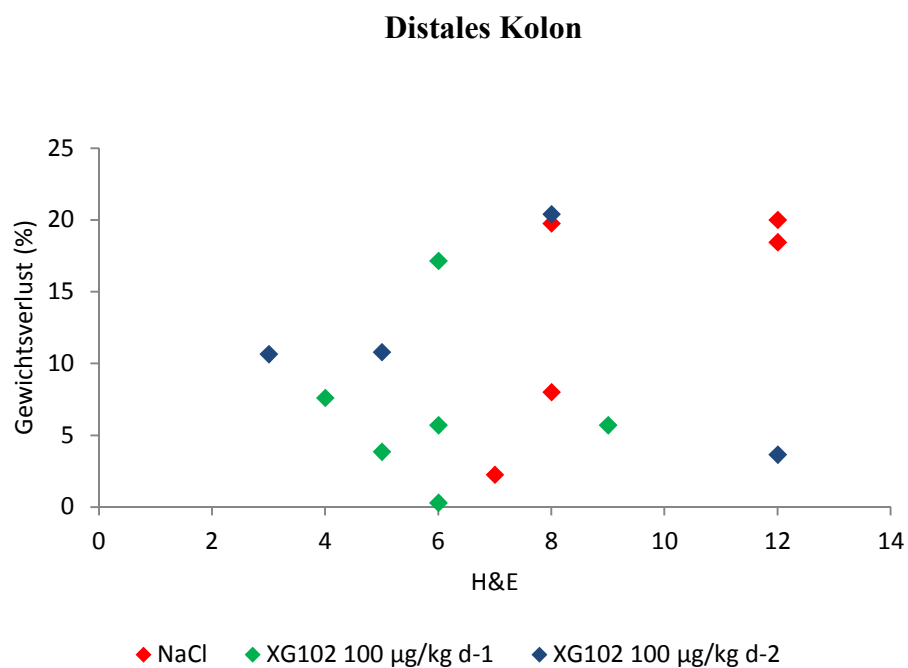
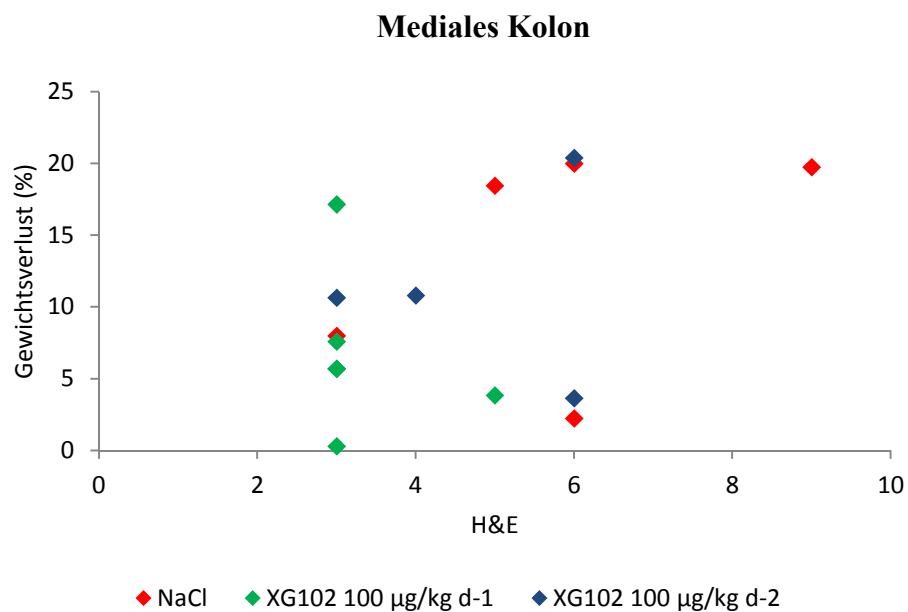


Abb.21: Die Korrelation der histologischen Änderung (Summe der Mittelwerte) gegen den Gewichtsverlust (%) für jedes Tier der Gruppe XG102 d-1/d-2 und der Kochsalz-Gruppe



3.3.2 Intravenöse Applikation von XG102

Subkutan konnte der JNK-Inhibitor XG102 eine signifikante Reduktion der Gewebeerstörung im Kolon bei der TNBS-Kolitis in der Maus hervorrufen. Trotzdem besteht die Notwendigkeit, andere Applikationswege zu testen. Eine mögliche Form, den Inhibitor zur Verfügung zu stellen, ist die intravenöse Applikation.

Aus diesem Grund wurde im folgenden Versuch 1 µg/kg XG102 in die Schwanzvene der Mäuse gespritzt. Als Vergleichslösung wurde PBS (*Phosphate Buffered Saline*) gewählt, da diese Lösung einen konstanten pH-Wert aufweist, isotonisch ist und somit keinen Einfluss auf die Zellen zeigt.

Den unterschiedlichen Gruppen wurde wieder direkt vor der TNBS-Applikation das PBS oder XG102 injiziert und der Versuch nach drei Tagen beendet.

Die histologische Untersuchung in der H+E-Färbung zeigte keine signifikanten Unterschiede (Tab. 9). Sowohl im medialen als auch im distalen Kolon konnten bei den mit XG102 behandelten Tieren Ulzerationen, Kryptenverlust und Infiltrationen beobachtet werden (Tab. 9).

Ein positiver Trend zeigte sich im distalen Kolon. Hier wiesen die drei XG102-Tiere eine Reduktion der Infiltrate um die Hälfte auf (Tab. 10).

In der Korrelation des DAI und der H+E-Färbung wies die XG102-Gruppe zwar einen signifikant geringeren DAI auf, doch in der H+E-Färbung zeigten sich genauso starke Ulzerationen und Kryptenverluste wie bei den mit PBS behandelten Kontrolltieren.

Tiere, denen nur PBS appliziert wurde, verloren bis zu 20% ihres Gewichtes (Abb. 23). Die mit XG102 behandelte Gruppe hatte einen maximalen Gewichtsverlust von 6% zu verzeichnen. Jedoch entwickelten beide Gruppen eine durchschnittlich gleich starke Kolitis (Abb. 24).

Abb.22: Histologische Änderung von XG102 iv; Mittelwerte der Summen von Ulzeration, Krypten und Infiltration pro Tier der Tabelle 10. Das Histogramm präsentiert die Kolonhistologie an Tag 3 nach PBS- oder XG102- Applikation nach TNBS- Gabe sowie die unbehandelten Kontrolltiere.

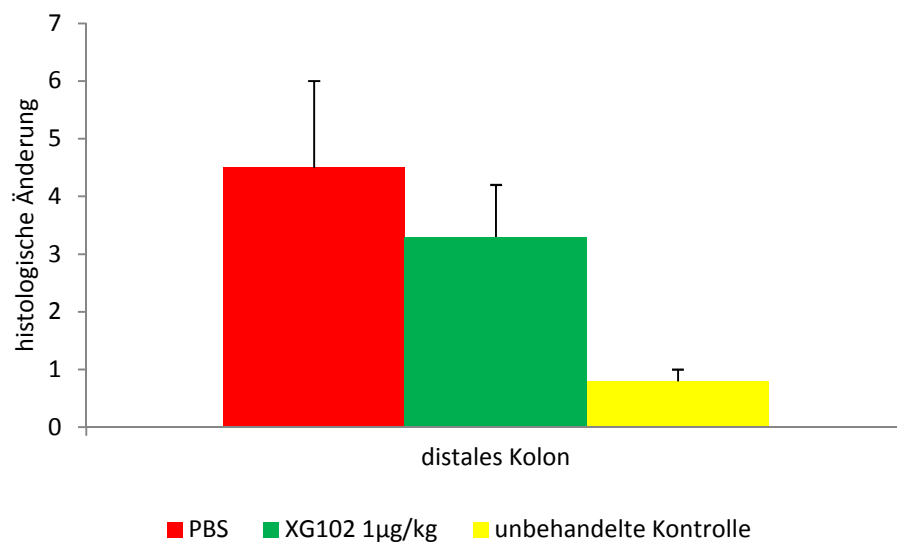
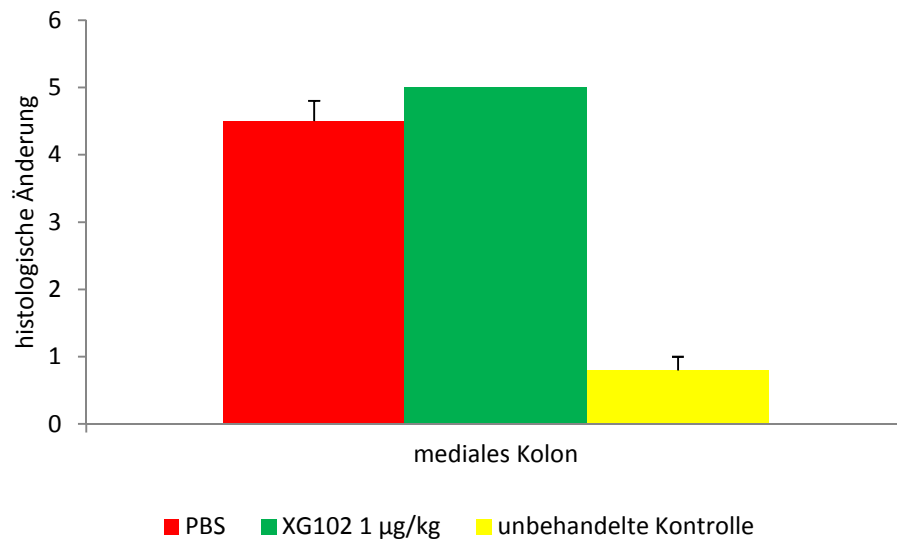


Tabelle 10: Histologische Daten von XG102 iv

Die histologische Änderung entspricht dem Mittelwert der einzelnen histologischen Werte. Diese stellt eine Addition aus Krypten, Ulzeration und Infiltration dar. Die histologische Änderung wird in Abbildung 20 grafisch dargestellt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mittels Anova ermittelt.

N= Anzahl der für diese Versuchsgruppe eingesetzten Tiere

Mediales Kolon	PBS (N=4)	XG102 1 µg/kg (N=3)	Unbehandelte Kontrolle (N=5)
I) Ulzeration	1,8±0,2	2,0±0	0±0
II) Krypten	1,8±0,2	2,0±0	0,4±0,2
III) Infiltration	1,0±0	1,0±0	0,4±0,2
Summe der Mittelwerte ± Standardfehler	4,5±0,3	5,0±0	0,8±0,2
Distales Kolon	PBS (N=4)	XG102 1 µg/kg (N=3)	Unbehandelte Kontrolle (N=5)
I) Ulcera	1,5±0,5	1,3±0,3	0±0
II) Krypten	1,5±0,5	1,3±0,3	0,6±0,2
III) Infiltration	1,5±0,5	0,7±0,3	0,2±0,2
Summe der Mittelwerte ± Standardfehler	4,5±1,5	3,3±0,9	0,8±0,2

Abb.23: Die Korrelation der histologischen Änderung (Summe der Mittelwerte) gegen den Disease-Activity-Index für jedes Tier der Gruppe XG102 und der PBS-Gruppe

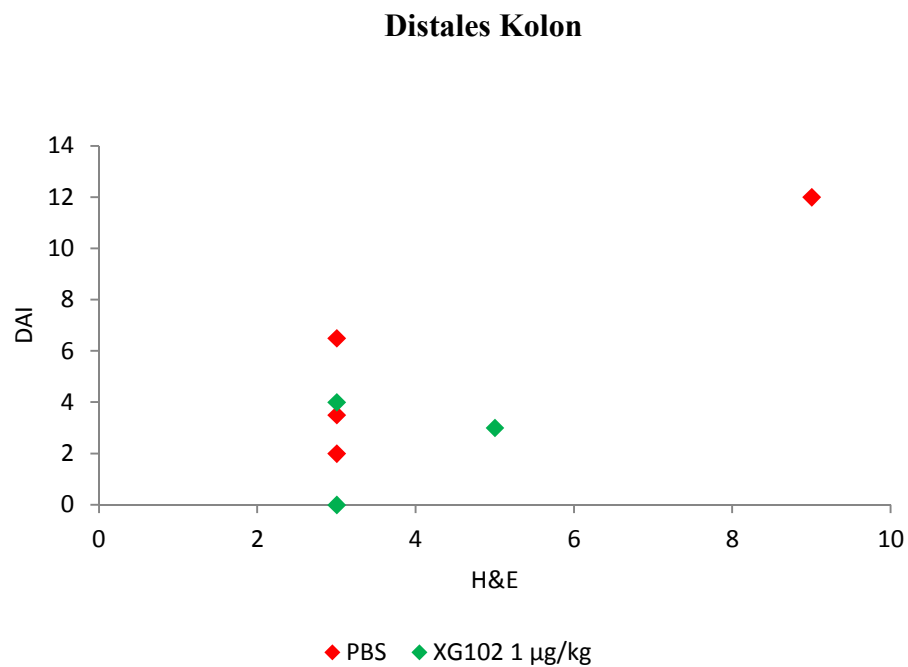
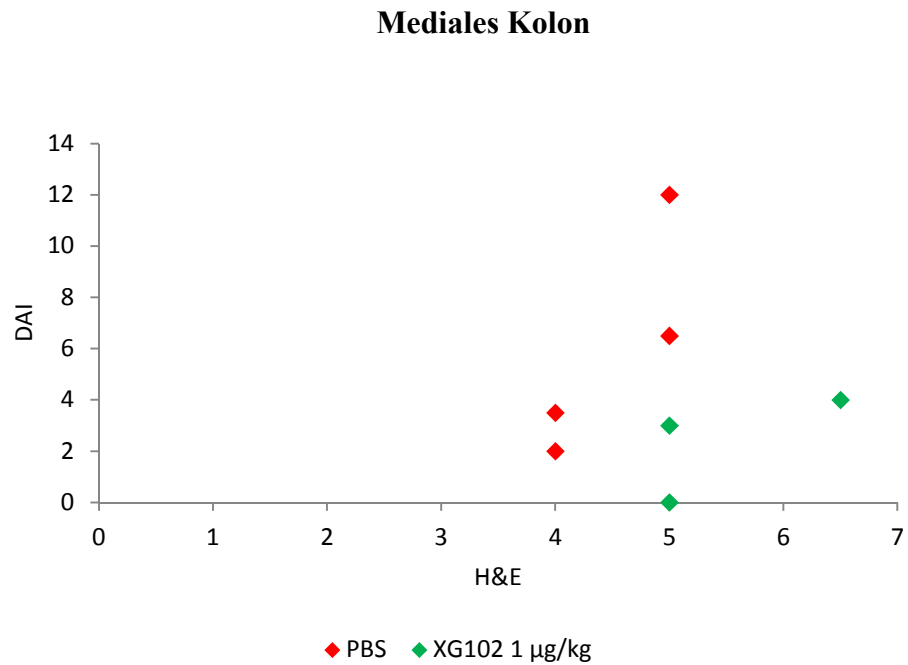
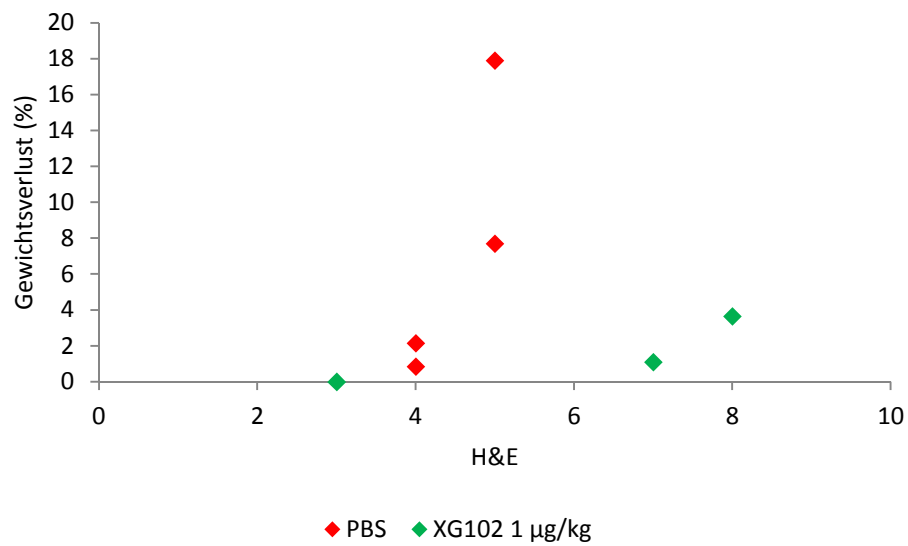
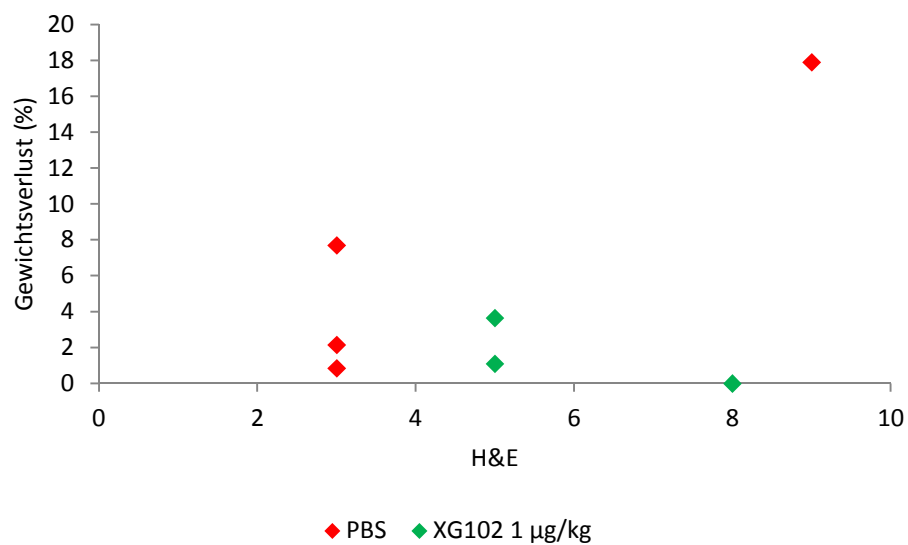


Abb.24: Die Korrelation der histologischen Änderung (Summe der Mittelwerte) gegen den Gewichtsverlust (%) für jedes Tier der Gruppe XG102 und der PBS-Gruppe

Mediales Kolon



Distales Kolon



3.3.3 XG102 oral Set 1-3

Nachdem in der vorigen Versuchsreihe die intravenöse Applikation untersucht wurde, sollte in der folgenden die orale Verabreichung des JNK-Inhibitors XG102 überprüft werden. Dazu wurde den Tieren der Wirkstoff per os via Gavage verabreicht. Als Vergleichsgruppe dienten Tiere, die physiologische Kochsalzlösung (NaCl) erhielten sowie eine Gruppe von Tieren, die mit Sulfasalazin behandelt wurde. So bestand wieder ein direkter Vergleich zur Standardtherapie. Die Versuchsreihe erstreckte sich wieder über drei Tage, sodass eine ausreichend starke Kolitis und eine Vergleichbarkeit zu den anderen untersuchten Verabreichungsformen (subkutan, intravenös und präexposition) gegeben war.

In der Auswertung zeigten sich signifikante Effekte vor allem in der Gruppe, die mit XG102 in der Dosierung 1 mg/kg behandelt wurde.

Hier konnte XG102 die Ulzerationen verringern, die Kryptenstruktur erhalten und den Verlust von Becherzellen verhindern (Tab.10). Auch die Infiltration konnte signifikant gesenkt werden im Vergleich zu der Gruppe, die physiologische Kochsalzlösung erhalten hatte. Verglichen mit der Gruppe, die das antientzündlich wirksame Sulfasalazin erhalten hatte, konnte XG102 die Infiltration um 50% senken. Diese Effekte ließen sich im medialen Kolon beobachten.

Im distalen Kolon konnten keine signifikanten Effekte ausgemacht werden im Hinblick auf Ulzerationen und Krypten. Es zeigte sich aber eine deutliche Senkung der Infiltration um 50% im Vergleich zu der NaCl-Gruppe (Tab.10).

Die Betrachtung der klinischen Parameter DAI und Gewichtsverlust wies für die XG102-Gruppe sowohl einen deutlich niedrigeren DAI auf, als auch einen durchschnittlich geringeren Gewichtsverlust (Abb. 26 und Abb. 27).

Auch hier waren die stärksten Effekte in der Dosierung 1 mg/kg zu beobachten.

Insgesamt zeigte sich in dieser Versuchsreihe eine stärker ausgeprägte Wirkung am medialen Kolon.

Im Hinblick auf den Zusammenhang zwischen histologischer Änderung und DAI (Abb. 26) zeigt sich, dass in dieser Versuchsreihe vor allem die mit XG102 behandelten Tiere mit der Dosierung 100 µg/kg einen geringen histologischen Score sowie einen niedrigen DAI aufweisen. Die Gruppe, die physiologische Kochsalzlösung erhalten hatte, weist einen höheren histologischen Score auf bei schwankendem DAI. Insgesamt lässt sich im medialen Kolon aber kein Zusammenhang zwischen dem histologischen Score und dem DAI nachweisen.

Dies gilt auch für das distale Kolon. Hier weisen zwar die mit XG102 behandelten Gruppen die niedrigsten histologischen Änderungen auf, aber keine Korrelation mit dem DAI. Die mit Kochsalz behandelten Tiere zeigen sowohl den höchsten histologischen Score als auch den größten DAI, jedoch nicht in direkter Korrelation sondern in Betrachtung der Einzelwerte.

In der Auswertung der Korrelation der histologischen Änderung gegen den Gewichtsverlust (Abb. 27) lässt sich hingegen im medialen Kolon ein Zusammenhang zwischen histologischem Score und Gewichtsverlust nachweisen. Die XG-Gruppen wiesen einen signifikant geringeren Gewichtsverlust auf; die Tiere, die die Dosierung 1 mg/kg erhielten, nahmen sogar an Gewicht zu. Der geringe histologische Score korreliert mit geringem Gewichtsverlust bis zu 4 %. In der Sulfasalazin- Gruppe korrelieren die beiden Parameter histologischer Score und Gewichtsverlust nicht miteinander, es lässt sich aber sagen, dass auch hier ein signifikant geringerer Gewichtsverlust vorliegt, trotz relativ erhöhtem histologischen Score. Die Tiere, die physiologische Kochsalzlösung erhalten hatten, weisen sowohl einen erhöhten histologischen Score als auch einen höheren Gewichtsverlust auf, jedoch nicht in direkter Korrelation.

Im distalen Kolon (Abb. 27) zeigt sich ein ähnliches Ergebnis in der Betrachtung der Korrelation für die XG102 –Gruppe, die die Dosierung 1 mg/kg erhielt. Für alle untersuchten Gruppen ergibt sich keine Korrelation zwischen den Ergebnissen des histologischen Scores und des Gewichtsverlustes, nur in der Einzelbetrachtung.

Abb.25: Histologische Änderung von XG102 po 1-3; Mittelwerte der Summen von Ulzeration, Krypten und Infiltration pro Tier der Tabelle 11. Das Histogramm präsentiert die Kolonhistologie an Tag 3 nach TNBS- Applikation für die Kochsalz-, die Sulfasalazin und die XG102 – Gruppe sowie die unbehandelten Kontrolltiere.
Signifikanzen: * $p = < 0,05$

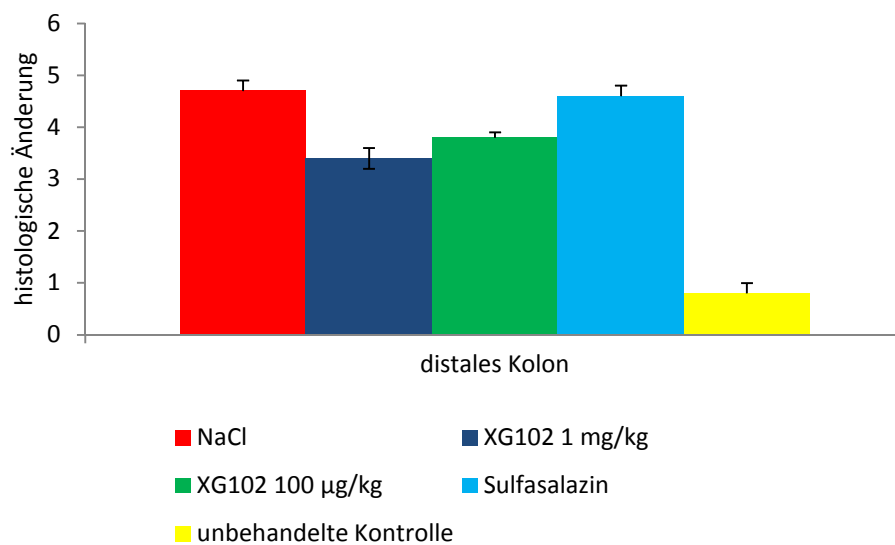
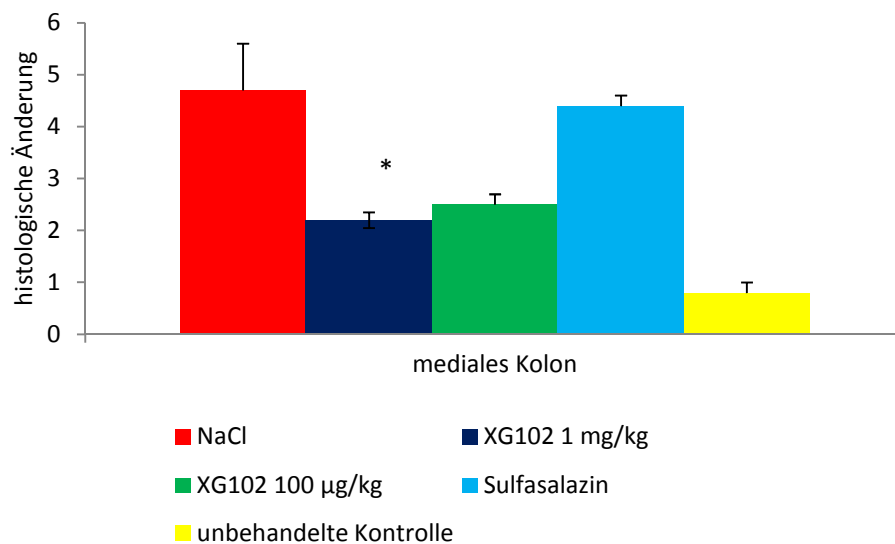


Tabelle 11: Histologische Daten von XG102 p.o. Set 1-3

Die histologische Änderung entspricht dem Mittelwert der einzelnen histologischen Werte. Diese stellt eine Addition aus Krypten, Ulzeration und Infiltration dar. Die histologische Änderung wird in Abbildung 25 grafisch dargestellt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mittels Anova ermittelt. Ebenso die Signifikanzen:

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$;

N= Anzahl der für diese Versuchsgruppe eingesetzten Tiere

Mediales Kolon	NaCl (N=16)	XG102 1 mg/kg (N=16)	XG102 100 µg/kg (N=6)	Sulfasalazin (N=3)	Unbehandelte Kontrolle (N=5)
I) Ulzeration	1,7±0,2	1,±0,1*	1,0±0	1,7±0,2	1,7±0,2
II) Krypten	1,6±0,2	0,7±0,2**	1,0±0	1,7±0,3	1,7±0,3
III) Infiltration	1,4±0,2	0,5±1,7**	0,5±0,2*	1,0±0,5	1,0±0,5
Summe der Mittelwerte ± Standardfehler	4,7±0,9	2,2±0,1*	2,5±0,2	4,4±0,2	4,4±0,2
Distales Kolon	NaCl (N=16)	XG102 1µg/kg (N=16)	XG102 100µg/kg (N=6)	Sulfasalazin (N=3)	Unbehandelte Kontrolle (N=5)
I) Ulcera	1,6±0,2	1,3±0,1	1,3±0,2	2,0±0	0±0
II) Krypten	1,6±0,2	1,3±0,1	1,0±0,4	1,3±0,2	0,6±0,2
III) Infiltration	1,5±0,1	0,8±0,1	1,5±0,2	1,3±0,3	0,2±0,2
Summe der Mittelwerte ± Standardfehler	4,7±0,2	3,4±0,2	3,8±0,1	4,6±0,2	0,8±0,2

Abb.26: Die Korrelation der histologischen Änderung (Summe der Mittelwerte) gegen den Disease-Activity-Index für jedes Tier der Gruppe XG102, der Sulfasalazin-Gruppe und der Kochsalz-Gruppe

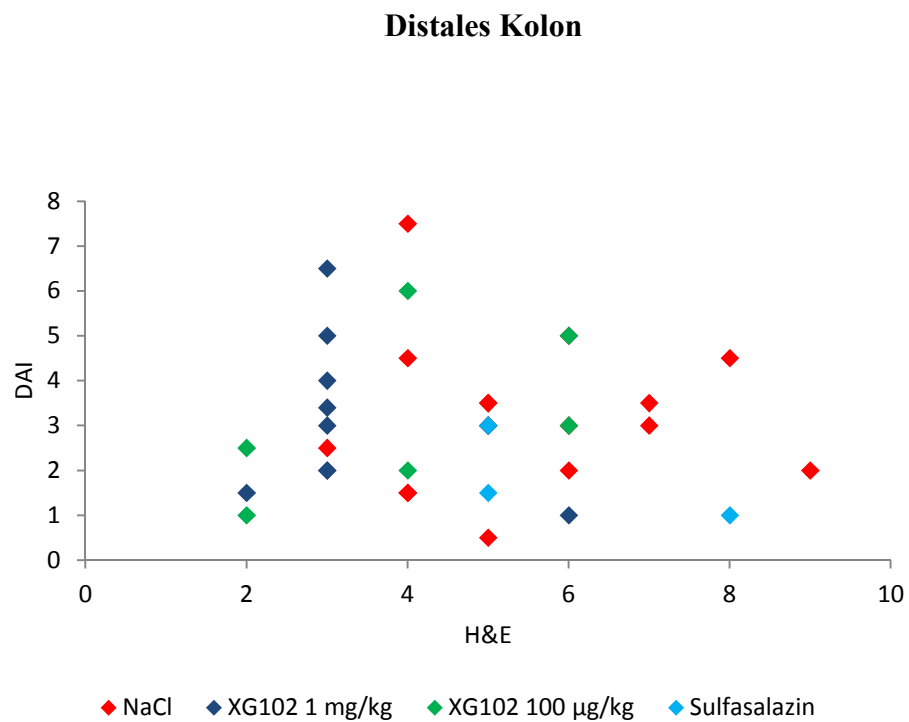
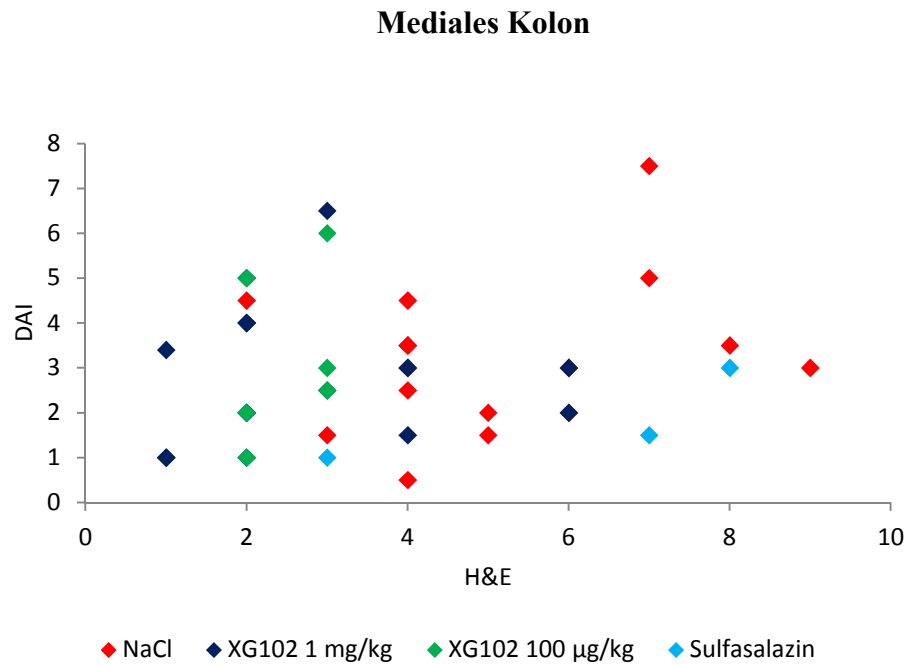
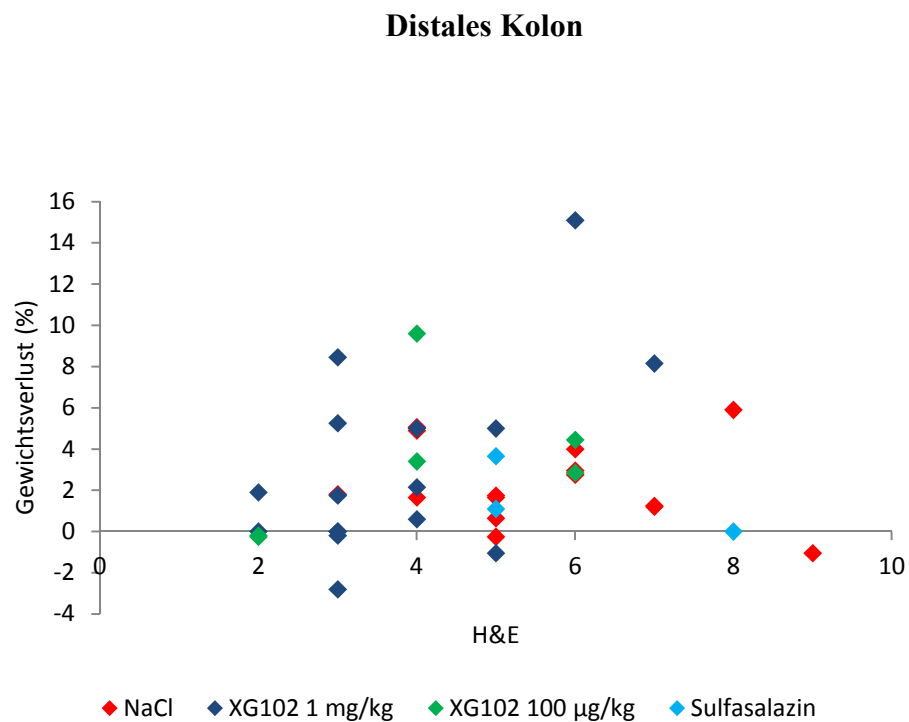
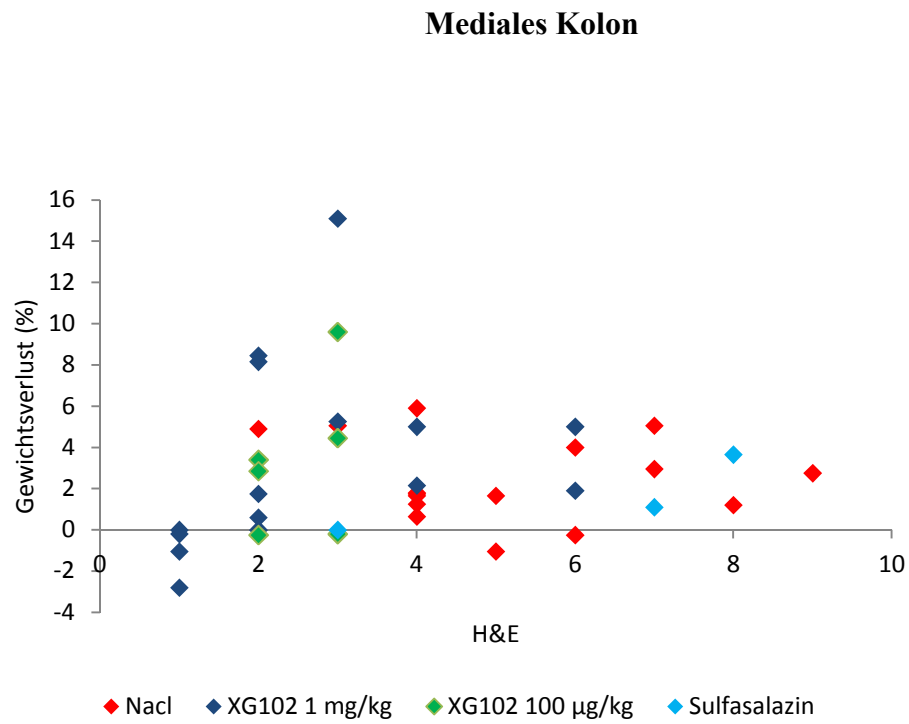


Abb.27: Die Korrelation der histologischen Änderung (Summe der Mittelwerte) gegen den Gewichtsverlust (%) für jedes Tier der XG102-Gruppe, der Sulfasalazin-Gruppe und der Kochsalz-Gruppe



4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der JNK- Hemmstoffe XG102 und XG10X im Modell der TNBS- induzierten Kolitis in BALB/C- Mäusen untersucht im Hinblick auf die Veränderung des klinischen und des histologischen Zustandes.

4.1 Limitationen

Stichprobenumfang

Die Anzahl der Tiere, die nach Versuchsende in die Auswertung eingeschlossen wurden, beträgt N=124, so dass von einem kleinen bis mittleren Stichprobenumfang gesprochen werden kann. Dies stellt vor allem für komplexere statistische Verfahren und weitergehende allgemeingültige Schlussfolgerungen eine Limitation dar. Begrenzender Faktor ist hier die Tatsache, dass ein Tierversuch ethisch vertretbar sein und im Verhältnis zu den Erfolgsaussichten des Versuches stehen muss.

Auswahlkriterien

Da sich bereits in Vorversuchen der Firma XIGEN (Xigen unpublished) weibliche Mäuse des BALB/C – Stammes als geeignet im Versuch der TNBS-induzierten Kolitis mit JNK-Inhibitoren erwiesen hatten, wurden die Versuchsreihen mit diesen Tieren durchgeführt.

Methodik

In der methodischen Untersuchung und Auswertung ist das Vorhandensein aller drei Gütekriterien gefordert: Objektivität, Validität und Reliabilität.

Die Objektivität in der Nachuntersuchung konnte gewährleistet werden durch eine Bewertung der histologischen Präparate, die doppelblind durchgeführt wurde. Auch die Bewertung des *Disease-Activity-Index* erfolgte verblindet, wurde jedoch im Gegensatz zu der histologischen Auswertung nur von ein und derselben Person durchgeführt, da die Beurteilung des DAI eine gewisse Erfahrung sowie Kontinuität in Versuchen der murinen Kolitis voraussetzt.

Die Validität der vorliegenden Untersuchung ist gesichert durch das Vorhandensein erprobter Kolitismodelle, denen ein ähnliches System mit zwei verschiedenen Scores (klinisch und histologisch) zugrunde liegt (Wirtz und Neurath, 2000). Um eine gute Quantifizierbarkeit bei geringstmöglicher Subjektivität zu erreichen, wurde in diesem Modell lediglich die

Bewertung der Stuhlkonsistenz nur in drei Kategorien („hart“, „weich“ und „geformt“) durchgeführt. Durch die Verwendung eines erprobten Modelles konnte auch die Konstruktvalidität sichergestellt werden. Durch die Kombination der klinischen und histologischen Parameter kann – wie es die Konstruktvalidität fordert – ein nachvollziehbares und vollständiges Bild der murinen Kolitis gewonnen werden.

Gleiches wie für die oben genannten Kriterien gilt auch für die Reliabilität der Versuche, da ein bereits erfolgreich erprobtes Modell verwendet wurde, dass auch hier die gewünschten Ergebnisse hinsichtlich der murinen Kolitis erzielen konnte. Durch die doppelblinde zweifache Auswertung der histologischen Parameter konnte auch die Interrater- Reliabilität sichergestellt werden.

Die größte Limitation innerhalb der Methodik ergibt sich aus der komplexen Bewertung des *Disease-Activity-Index*, die nur von einer Person durchgeführt wurde sowie eventuellen Fehleinschätzungen während der histologischen Auswertungen, da sie nicht von einem spezialisierten Pathologen durchgeführt wurden, sondern durch die Arbeitsgruppe.

Verallgemeinerbarkeit der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnten die JNK- Inhibitoren XG102 und XG10X im Modell der murinen Kolitis einen signifikanten Effekt aufweisen hinsichtlich einer Reduktion der Inflammation. Die beobachteten Effekte hinsichtlich der Kolitis waren jene, die auch in vorhergehenden Studien mit einem identischen Modell beobachtet werden konnten (Wirtz und Neurath, 2000). In anderen Bereichen, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis (Han et al. 2001) konnten ähnliche Beobachtung hinsichtlich der antiinflammatorischen Wirkung von JNK- Inhibitoren gemacht werden.

Da es sich bei der untersuchten Anzahl von Tieren aber nur um eine relativ kleine Stichprobe handelt, ist es lediglich möglich, die Ergebnisse in den Gesamtzusammenhang der antientzündlichen Wirkung von JNK- Hemmstoffen einzuordnen. Weitergehende Schlüsse hinsichtlich einer tatsächlichen therapeutischen Wirkung bedürften eines deutlich größeren Stichprobenumfangs.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Untersuchung konnten die JNK- Inhibitoren XG102 und XG10X ihre Wirksamkeit im Modell der TNBS-induzierten Kolitis unter Beweis stellen. Die erwiesene

signifikante Reduktion von Inflammation, Ulzeration und Protektion der Kryptenstruktur werfen zunächst zwei grundlegende Fragen auf:

1. Wie beeinflussen die c-Jun- Kinasen Inflammationen im Bereich der Darms?
2. Warum kann davon nachfolgend ausgegangen werden, dass die JNK- Inhibitoren XG102 und XG10X an dieser Stelle angreifen und die beobachteten Effekte bewirkt haben?

Zu einer allgemeinen Beteiligung der JNK an akuten und chronischen Entzündungen gibt es bereits zahlreiche Veröffentlichungen. Einen guten Überblick sowie eine Einordnung in den Gesamtzusammenhang der MAP- Kinasen verschafft ein Review von Waetzig und Schreiber aus dem Jahr 2003. Demnach nehmen die JNK vor allem in ihrem Wechselspiel mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF α eine zentrale Rolle in inflammatorischen Prozessen ein. Sie werden durch TNF α und weitere Zytokine wie IL-1 aktiviert (Kyriakis et al. 2001) und sind auf der anderen Seite essentiell für die TNF α induzierte Expression von E-Selectin auf Endothelzellen, das eine entscheidende Rolle für die Adhäsion von und die Infiltration durch Leukozyten spielt. Weiterhin sind die JNK im Zusammenspiel mit ERK1/2 und p38 in der Lage, eine inflammatorische Reaktion nicht nur zu triggern, sondern auch zu verlängern, durch die Entstehung von reaktiven Sauerstoffradikalen in Neutrophilen (Tournier et al. 1997). Zentral für die Aktivität von JNK in Inflammationen sind also die Zytokine TNF α sowie die Induzierung einer Leukozyten- Infiltration über die Expression von E-Selectin. Bei der näheren Betrachtung des Wechselspiels von TNF α und den JNK fällt auf, dass c- Jun- Kinasen die TNF α - Spiegel im Rahmen einer Akute-Phase- Reaktion auf bakterielle LPS beeinflussen (Swantek et al. 1997). Hier lässt sich der Bogen von JNK in inflammatorischen Prozessen allgemein hin zur Aktivität in Inflammationen des Darms schlagen: Zellen der Lamina propria des Darms, die Patienten mit Morbus Crohn entnommen wurden, verlieren ihre Toleranz gegenüber bakteriellen LPS (Baumgart et al. 2005) und produzieren gleichzeitig signifikant größere Mengen der inflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 (Schreiber et al. 1999). In derselben Studie von Schreiber et al. aus dem Jahr 1999 konnte erstmals eine direkte Aktivität von c-Jun-Kinasen in entzündetem Kolongewebe von Patienten mit Morbus Crohn nachgewiesen werden.

Wie oben schon erwähnt zeichnet sich die Morbus Crohn durch eine Th1 abhängige Immunantwort aus, die durch die Zytokine IFN γ , IL-12 und TNF α geprägt ist. Diese Zytokine werden auch im Modell der TNBS-induzierten Kolitis vermehrt produziert, sodass sich eine gute Vergleichbarkeit ergibt und zugleich eine Aktivität der c-Jun- Kinasen auch in diesen Versuchen angenommen werden kann. An dieser Stelle könnte weiterführend die

Phosphorylierungsaktivität der c-Jun- Kinasen im entzündeten Kolongewebe der Versuchstiere untersucht werden.

Wie oben schon beschrieben, spielt TNF α eine zentrale Rolle im Entzündungsprozess. Histologisch geht eine gesteigerte TNF α Produktion mit starker Ödem- und Nekrosebildung einher (Ventura et al. 2004). Bedingt durch das Wechselspiel zwischen TNF α und JNK müsste eine JNK- Hemmung also auch zugleich eine Senkung des TNF α - Spiegels und eine geringere Ödem- und Nekrosenbildung bewirken. Aus dieser Überlegung heraus wurde bereits der ATP-kompetitive JNK-Inhibitor SP600125 in einem dieser Arbeit ähnlichen Versuchsaufbau der murinen Kolitis untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass sich durch eine JNK- Hemmung sowohl der TNF α -Spiegel signifikant senken als auch die histologischen Parameter Ulzeration, Infiltration reduzieren ließen (Assi et al. 2006). Eine Einflussnahme von JNK- Inhibitoren auf entzündliche intestinale Prozesse ist also möglich.

Der untersuchte JNK- Inhibitor XG102 wurde bisher noch nicht im Modell der TNBS-induzierten Kolitis untersucht, konnte aber bereits in anderen Modellen entzündlicher Prozesse seine Wirksamkeit unter Beweis stellen. In einer Studie von Touchard et al. aus dem Jahr 2010 wurde XG102 zur Behandlung einer Endotoxin-induzierten Uveitis in Ratten eingesetzt. Der Entzündungsreiz wird durch bakterielle Lipopolysaccharide verursacht und führt zu messbar erhöhter JNK-Aktivität sowie einer vermehrten TNF α -Ausschüttung. Mittels XG102 konnten sowohl die Inflammation als auch der TNF α -Spiegel signifikant reduziert werden. Dabei wurde die spezifische Wirksamkeit von XG102 anhand der reduzierten Phosphorylierung der JNK im untersuchten Gewebe nachgewiesen.

Anhand der vorliegenden Studien sowie der Vorarbeiten der Firma Xigen (Xigen unveröffentlicht) kann von einer JNK-spezifischen Wirkung von XG102 ausgegangen werden, auch wenn diese nicht direkt in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde.

Im weiteren Verlauf der Diskussion sollen nun die einzelnen Applikationsformen näher betrachtet werden.

4.2.1 Subkutane Applikation von XG102 und XG10X

Die subkutane Applikation von XG102 und XG10X konnte eine signifikante Reduktion der histologischen Parameter Ulzeration, Inflammation und Infiltration erzielen. Der DAI wurde gesenkt und eine Korrelation zwischen klinischem Bild und histologischem Befund nachgewiesen. Besonders ausgeprägt ließ sich dies im medialen Kolon nachweisen. Im distalen Kolon konnte zusätzlich eine signifikante Reduktion der Infiltrationen beobachtet werden. Ähnlich wirksam zeigte sich XG102 in der protektiven Versuchsreihe bei einer Verabreichung 24 Stunden vor Versuchsbeginn. Eine Gabe 48 Stunden vorher zeigte sich ohne signifikanten Effekt.

In der Betrachtung dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, warum eine subkutane Verabreichung sowohl direkt vor Versuchsbeginn als auch 24 Stunden zuvor wirksam ist, während eine Gabe 48 Stunden vorher keine Wirksamkeit erkennen lässt.

Dies wirft wiederum die Frage auf, ob die Peptid- Inhibitoren XG102 und XG10X aufgrund ihrer Pharmakokinetik keinen ausreichend hohen Wirkspiegel über diesen Zeitraum aufrecht erhalten können. Eine Schwierigkeit in der Untersuchung dieser Hypothese stellt die Tatsache dar, dass die genaue chemische Struktur der Wirkstoffe nur der Firma Xigen bekannt sind. Als Vorteil der JNK-Inhibitoren auf Peptid-Basis gilt aber eine zielgenaue Wirkung mit nur geringen Nebenwirkungen, was einen Fortschritt im Vergleich zu Inhibitoren auf Protein-Basis darstellt. Dennoch ist das größte Problem ihrer Verwendung nach wie vor die schnelle Degradation in Verbindung mit einer schlechten Membrangängigkeit (Waetzig und Herdegen, 2005). Über die schnelle Degradation ließe sich die fehlende Wirksamkeit von XG 102 im 48 Stunden Versuch erklären. Zusätzlich könnte die Wirksamkeit noch durch eine Akkumulation in tiefen Kompartimenten beeinträchtigt sein, da diese durch eine subkutane Verabreichung noch begünstigt würde.

Die nachgewiesenen positiven Effekte einer Verabreichung von XG102 24 Stunden vor Versuchsbeginn lassen sich aber durch bereits durchgeführte Studien zur protektiven Gabe von JNK- Inhibitoren bestätigen. Bereits im Jahr 2001 konnte die Arbeitsgruppe um Han et al. im Modell der rheumatoiden Arthritis eine Reduktion der Inflammation nachweisen (Han et al. 2001). In dieser Untersuchung konnte der JNK- Inhibitor SP600125 bei Gabe vor Versuchsbeginn sowohl die JNK- Aktivität als auch den TNF α Spiegel signifikant senken. Auch in dieser Arbeit konnten Inflammationen und Ulzerationen bei protektiver Gabe signifikant reduziert werden. Ob dies im tatsächlichen Zusammenhang mit einer Senkung des TNF α Spiegels steht, könnte weiterführend untersucht werden. Hierbei müssten JNK- Aktivität sowie TNF α – Spiegel vor, während und nach dem Versuch bestimmt werden.

In dieser Versuchsreihe konnte neben signifikanten Effekten aber auch in allen drei Gruppen eine vermehrte Ödembildung im distalen Kolon beobachtet werden.

TNBS erzeugt wie schon bekannt eine Kolitis, die durch Ulzerationen gekennzeichnet ist. Zugrundeliegend ist eine massive Inflammation, die allein bereits zu starker Ödembildung führen kann. Zudem kann durch die hohe Ethanolkonzentration (50%), die notwendig ist, um eine Permeabilität für das TNBS durch die Darmmukosa zu gewährleisten, ein hyperosmolares Milieu im Darmlumen entstehen. Durch Hyperosmolarität kommt es zu einer NF- κ B Aktivierung sowie zu einer erhöhten Produktion des Zytokins IL-8 (Nemeth et al. 2002). Dieser Prozess verstärkt die Inflammation und verlängert sie. Weiterhin sind Verletzungen der Darmmukosa bei Applikation des TNBS nicht auszuschließen.

Letztlich muss die Ursache aber offenbleiben. Es lässt sich jedoch festhalten, dass XG102 im Falle einer besonders starken Entzündung seine Wirkung möglicherweise verliert. Dies kann zu fehlender Reliabilität innerhalb der Versuchsreihen führen.

4.2.2 Intravenöse Applikation von XG102

In dieser Versuchsreihe konnten durch den JNK- Inhibitor XG102 die entzündlichen Infiltrate um 50% reduziert werden. Weiterhin wurde eine Reduktion des DAI im Vergleich zur Vergleichsgruppe, die nur PBS erhielt, beobachtet. Dass eine intravenöse Verabreichung möglich ist und im Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bereits erprobt wurde, lässt sich anhand einer Studie mit dem JNK- und MAP-Kinasen-Inhibitor CNI-1493 zeigen (Hommes et al. 2002). In dieser Pilotstudie wurde CNI-1493, ein synthetisches Guanylhydrazon, an 12 Patienten, die an Morbus Crohn erkrankt waren, getestet. CNI-1493 hemmt in einem Downstream- Mechanismus die Phosphorylierung von p38 MAPK und JNK durch Wechselwirkungen mit Upstream- Kinasen und führt zu einer Senkung des TNF α - Levels (Waetzig und Schreiber, 2003). Durch Verwendung von CNI-1493 konnte der CDAI (*clinical disease activity index*) signifikant bei allen Patienten gesenkt werden. Endoskopisch wurde eine Regeneration der Darmwand und der Verschluss von Fisteln beobachtet. Interessanterweise verschwand in allen Patienten Morbus Crohn assoziierte Arthritis, was bereits in anderen Studien mit einer Senkung des TNF α – Levels in Verbindung gebracht wurde (Han et al. 2001).

Trotz einer Reduktion der histologisch sichtbaren Inflammation und einer Senkung des DAI lässt sich für diese Versuchsreihe keine Korrelation der beiden Parameter feststellen. Pathologie und Klinik sind verschieden. Diese Abweichungen sind vermutlich auf einen individuell unterschiedlichen Krankheitsverlauf zurückzuführen. Um Fehler an dieser Stelle auszuschließen, soll die Zusammensetzung des DAI noch einmal überprüft werden.

Der *Disease-Activity-Index* gliedert sich in die Parameter Gewichtsverlust, Stuhlkonsistenz und den Nachweis von Blut im Stuhl. Das Gewicht ließ sich bei allen Tieren bis auf die dritte Dezimalstelle nach dem Komma bestimmen, was eine genaue Berechnung des Gewichtsverlust sichert. Die Stuhlkonsistenz wurde bewusst nur in drei Kategorien eingeteilt, also „hart“, „weich“ und „Diarrhoe“. In anderen Studien wurde noch eine vierte Kategorie eingeführt („weich, aber noch geformt“) (Wirtz et al. 2007). Um aber eine gute Quantifizierbarkeit bei geringstmöglicher Subjektivität zu erreichen, wurden in dieser Arbeit nur drei Kategorien verwendet.

Der Test auf okkultes Blut im Stuhl ist sehr exakt und unterliegt lediglich den üblichen Schwankungen in Sensitivität und Spezifität, die aus dem klinischen Gebrauch bekannt sind. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die verwendeten Parameter ein genauer Eindruck der Kolitis gewonnen werden kann.

4.2.3 Perorale Applikation von XG102

Nach den Erkenntnissen in der Forschung an MAPK-Inhibitoren könnten nach Ansicht vieler Kliniker oral verabreichbare Wirkstoffe teilweise die Aminosalicylate ersetzen, da sie eine Wirkstärke erreichen könnten, die zwischen der von Aminosalicylaten und Glukokortikoiden läge. Dies könnte besonders der Remissionserhaltung dienen (Schreiber et al. 2003).

Aus diesem Grund erfolgte in dieser Arbeit abschließend die orale Gabe von XG102.

Der Wirkstoff wurde den Tieren nach TNBS- Applikation via Gavage verabreicht.

Es zeigte sich für XG102 eine signifikante Reduktion von Infiltration, Ulzeration, Krypten- und Becherzellverlust sowie eine deutliche Senkung des DAI. Weiterhin konnte eine Korrelation zwischen histopathologischem Befund und DAI beobachtet werden.

Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, wie der JNK- Inhibitoren auf Peptid- Basis im oralen Versuch wirken konnte. Wie bereits erwähnt, ist die schnelle Degradation das größte Hindernis in der Verwendung von Peptid- Inhibitoren (Waetzig und Herdegen, 2005).

In Verbindung mit ihrer Hydrophilie ließe sich aber im durchgeführten Versuch vermuten, dass die Peptide nicht im Darm resorbiert werden, sondern über das Lumen direkt in die Epithelzellen hineindiffundieren können. Geht man von dieser Wirkweise aus, hätte man das Ziel erreicht, eine Wirkung ohne Nebenwirkungen zu erzielen. Für einen solchen Mechanismus spricht die Tatsache, dass Peptide an sich nur sehr schlecht in der Lage sind, Zellmembranen zu durchdringen. Ohne eine Wirkung an den Epithelzellen des Darmes hätten sich aber nicht die beobachteten Ergebnisse eingestellt.

Letztlich muss aber auch diese Fragestellung offenbleiben, da noch keine weiteren Arbeiten hierzu vorliegen.

5. Fazit und Ausblick

Die dargestellte Korrelation der Befunde dieser Arbeit mit denen der Literatur legen nahe, dass sowohl XG102 als auch sein Derivat XG10X potentielle Wirkstoffe in der JNK-Hemmung darstellen. Es konnten eine Verbesserung sowohl des klinischen Zustandes als auch der Histopathologie beobachtet werden. Die entscheidenden histologischen Marker einer Kolitis, Ulzerationen, Infiltrationen sowie der Verlust von Kryptenstruktur und Becherzellen, konnten durch XG102 und XG10X signifikant gebessert werden.

Der JNK- Inhibitor XG102 hat sich bereits in anderen Bereichen als wirksam erweisen können. XG102 konnte sich für die Indikationen Hörverlust, Apoplex und Inflammation in der Präklinik und klinischen Sicherheit bewähren und befindet sich derzeit in der klinischen Prüfung (Phase II) (Wang et al. 2003, Wiegler et al. 2008).

Diese klinischen Daten stützen die weitere Erforschung der JNK-Hemmstoffe auch hinsichtlich ihrer therapeutischen Wirksamkeit bei Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung der JNK- Inhibitoren XG102 und XG10X im Modell der TNBS-induzierten Kolitis in BALB/C- Mäusen erfasst. In den Versuchsreihen wurde weiblichen, 7 Wochen alten Mäusen ethanolische TNBS-Lösung (2 mg TNBS: 50% Ethanol) intrarektal appliziert. Durch seine Wirkung als Hapten erzeugt TNBS eine Th1-abhängige Immunantwort, die durch die Zytokine IL-2, IL-4, IFN γ und TNF α gekennzeichnet ist. Anschließend wurden die Tiere drei Tage lang beobachtet und anhand des *Disease-Activity-Index* (DAI), zusammengesetzt aus den Parametern Gewichtsverlust, Stuhlkonsistenz und Blut im Stuhl, bewertet. Das Gewicht wurde durch tägliches Wiegen bestimmt und Blut im Stuhl durch tägliche Hämoccult-Tests erfasst. Am dritten Tag wurden die Tiere mittels CO₂ getötet, der Darm entnommen und durch eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung histologisch aufbereitet. Anschließend erfolgte die Beurteilung nach vorher festgelegten Kriterien. Als Parameter dienten Ulzeration, Verlust der Kryptenstruktur sowie Infiltration durch Immunzellen. Es wurden drei verschiedene Applikationen getestet. In den Versuchsreihen 1-5 wurden den Tieren die JNK- Hemmstoffe XG102 in der Dosierung 100 $\mu\text{g/kg/KG}$ sowie 10 $\mu\text{g/kg/KG}$ verabreicht und XG10X in einer Dosierung von 100 $\mu\text{g/kg/KG}$ und 50 $\mu\text{g/kg/KG}$ subkutan in den Nacken gespritzt nach TNBS- Applikation. Im folgenden Versuch wurde einer Gruppe von Tieren XG102 bzw. XG10X 48 Stunden und einer anderen Gruppe 24 Stunden vor TNBS- Applikation verabreicht. Anschließend wurde die intravenöse Gabe geprüft, indem den Tieren XG102 (1 $\mu\text{g/kg/KG}$; gelöst in Phosphate Buffered Saline) in die Schwanzvene gespritzt wurde. Abschließend erfolgte die orale Gabe, bei der XG102 und XG10X den Tieren via Gavage verabreicht wurden (XG102: 1mg/kg/KG; XG10X: 100 $\mu\text{g/kg/KG}$). In allen Versuchen dienten als Kontrollgruppen Tiere, die lediglich Kochsalz erhielten sowie Tiere, denen als Vergleichsmedikation Sulfasalazin (10 mg/kg/KG) verabreicht wurde.

Im ersten Versuchsdurchlauf (Dauer: 7 Tage) zeigte sich kein Effekt, sodass die Versuchsdauer auf drei Tage verkürzt wurde.

In den Versuchsreihen 4-6 (XG102/XG10X subkutan) konnten beide JNK- Inhibitoren sowohl eine signifikante Reduktion der Infiltrationen um ein Drittel als auch eine signifikante Senkung des *Disease-Activity-Index* und eine Reduktion des Gewichtsverlustes bewirken.

Bei einer Gabe 24 Stunden vor TNBS- Applikation erzielte XG102 signifikante Effekte, während eine Gabe 48 Stunden vor TNBS- Applikation ohne Wirkung blieb.

In der intravenösen Versuchsreihe konnte XG102 eine Reduktion der Infiltrationen um 50% erzielen, allerdings nur im distalen Kolon. Im medialen Kolon blieb die Verabreichung ohne signifikanten Effekt.

Die orale Gabe von XG102 zeigte den größten Effekt in der Dosierung 1 mg/kg/KG anhand einer signifikanten Reduktion der Ulzerationen, der erhaltenen Kryptenstruktur sowie geringer Infiltration. In einer Dosis von 100 µg/kg/KG konnten die Infiltrationen um 50 % gesenkt werden.

Zusammenfassend konnten der JNK- Hemmstoff XG102 und sein Derivat XG10X, das sich durch eine kürzere Halbwertszeit auszeichnet, sowohl die Infiltrate und Ulzerationen reduzieren und einen positiven Effekt auf den *Disease-Activity- Index* bewirken.

7. Literaturliste

Assi K, Pillai R, Gomez-Munoz A, Owen D, Salh B. The specific JNK inhibitor SP600125 targets tumour necrosis factor-alpha production and epithelial cell apoptosis in acute murine colitis. *Immunology*. 2006;118(1):112-21. Epub 2006/04/25.

Autschbach F, Braunstein J, Helmke B, Zuna I, Schurmann G, Niemir ZI, et al. In situ expression of interleukin-10 in noninflamed human gut and in inflammatory bowel disease. *The American Journal of Pathology*. 1998;153(1):121-30. Epub 1998/07/17.

Avruch K. Constructing ethnicity: culture and ethnic conflict in the new world disorder. *The American Journal of Orthopsychiatry*. 2001;71(3):281-9. Epub 2001/08/10.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*. 2000;18:767-811. Epub 2000/06/03.

Bantel H, Schmitz ML, Raible A, Gregor M, Schulze-Osthoff K. Critical role of NF-kappaB and stress-activated protein kinases in steroid unresponsiveness. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002;16(13):1832-4. Epub 2002/09/12.

Bass H, Mosmann T, Strober S. Evidence for mouse Th1- and Th2-like helper T cells in vivo. Selective reduction of Th1-like cells after total lymphoid irradiation. *The Journal of Experimental Medicine*. 1989;170(5):1495-511. Epub 1989/11/01.

Baumgart DC, Metzke D, Schmitz J, Scheffold A, Sturm A, Wiedenmann B, et al. Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Gut*. 2005;54(2):228-36. Epub 2005/01/14.

Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, et al. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(24):13681-6. Epub 2001/11/22.

Boirivant M, Marini M, Di Felice G, Pronio AM, Montesani C, Tersigni R, et al. Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology*. 1999;116(3):557-65. Epub 1999/02/25.

Broom OJ, Widjaya B, Troelsen J, Olsen J, Nielsen OH. Mitogen activated protein kinases: a role in inflammatory bowel disease? *Clinical and Experimental Immunology*. 2009;158(3):272-80. Epub 2009/10/02.

Campbell JJ, Bowman EP, Murphy K, Youngman KR, Siani MA, Thompson DA, et al. 6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3beta receptor CCR7. *The Journal of Cell Biology*. 1998;141(4):1053-9. Epub 1998/06/20.

Chromik AM, Muller AM, Korner J, Belyaev O, Holland-Letz T, Schmitz F, et al. Genetic deletion of JNK1 and JNK2 aggravates the DSS-induced colitis in mice. *Journal of Investigative Surgery : the Official Journal of the Academy of Surgical Research*. 2007;20(1):23-33. Epub 2007/03/17.

Constant S, Pfeiffer C, Woodard A, Pasqualini T, Bottomly K. Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4⁺ T cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 1995;182(5):1591-6. Epub 1995/11/01.

Dabbagh K, Lewis DB. Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses. *Current opinion in infectious diseases*. 2003;16(3):199-204. Epub 2003/06/25.

Deng Y, Ren X, Yang L, Lin Y, Wu X. A JNK-dependent pathway is required for TNF α -induced apoptosis. *Cell*. 2003;115(1):61-70. Epub 2003/10/09.

De Smaele E, Zazzeroni F, Papa S, Nguyen DU, Jin R, Jones J, et al. Induction of gadd45 β by NF- κ B downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature*. 2001;414(6861):308-13. Epub 2001/11/20.

Dierck F, Histopathologie einer murinen Kolitis, Diplomarbeit am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie Kiel, 2009

Guo YL, Kang B, Williamson JR. Inhibition of the expression of mitogen-activated protein phosphatase-1 potentiates apoptosis induced by tumor necrosis factor- α in rat mesangial cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(17):10362-6. Epub 1998/05/30.

Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, et al. c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2001;108(1):73-81. Epub 2001/07/0

Haeusgen W, Boehm R, Zhao Y, Herdegen T, Waetzig V. Specific activities of individual c-Jun N-terminal kinases in the brain. *Neuroscience*. 2009;161(4):951-9. Epub 2009/04/15.

Hommes D, van den Blink B, Plasse T, Bartelsman J, Xu C, Macpherson B, et al. Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;122(1):7-14. Epub 2002/01/10.

Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut*. 2003;52(1):144-51. Epub 2002/12/13.

Howland KC, Ausubel LJ, London CA, Abbas AK. The roles of CD28 and CD40 ligand in T cell activation and tolerance. *Journal of Immunology*. 2000;164(9):4465-70. Epub 2000/04/26.

Hsieh CS, Heimberger AB, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(13):6065-9. Epub 1992/07/01.

Huang FP, Platt N, Wykes M, Major JR, Powell TJ, Jenkins CD, et al. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *The Journal of Experimental Medicine*. 2000;191(3):435-44. Epub 2000/02/09.

Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends in Immunology*. 2001;22(7):394-400. Epub 2001/06/29.

Karin M, Gallagher E. From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life*. 2005;57(4-5):283-95. Epub 2005/07/23.

Kuida K, Boucher DM. Functions of MAP kinases: insights from gene-targeting studies. *Journal of Biochemistry*. 2004;135(6):653-6. Epub 2004/06/24.

Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation.

Physiological Review 2001 Apr;81(2):807-69. Review.

Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*. 1994;372(6508):739-46. Epub 1994/12/22.

Milano G, Morel S, Bonny C, Samaja M, von Segesser LK, Nicod P, et al. A peptide inhibitor of c-Jun NH2-terminal kinase reduces myocardial ischemia-reperfusion injury and infarct size in vivo. *American Journal of Heart Physiology and Circulatory Physiology*. 2007;292(4):H1828-35. Epub 2006/12/13.

Mitsuyama K, Suzuki A, Tomiyasu N, Tsuruta O, Kitazaki S, Takeda T, et al. Pro-inflammatory signaling by Jun-N-terminal kinase in inflammatory bowel disease. *International Journal of Molecular Medicine*. 2006;17(3):449-55. Epub 2006/02/09.

Monteleone G, Biancone L, Marasco R, Morrone G, Marasco O, Luzzza F, et al. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology*. 1997;112(4):1169-78. Epub 1997/04/01.

Nemeth ZH, Deitch EA, Szabo C, Hasko G. Hyperosmotic stress induces nuclear factor-kappaB activation and interleukin-8 production in human intestinal epithelial cells. *The American Journal of Pathology*. 2002;161(3):987-96. Epub 2002/09/06.

Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature*. 1995;378(6552):88-91. Epub 1995/11/02.

Papa S, Zazzeroni F, Pham CG, Bubici C, Franzoso G. Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. *Journal of Cell Science*. 2004;117(Pt 22):5197-208. Epub 2004/10/16.

Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, et al. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *The American Journal of Pathology*. 1997;150(3):823-32. Epub 1997/03/01.

Pithadia AB, Jain S. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacol Rep*. 2011;63(3):629-42.

Pohl C, Hombach A, Kruis W. Chronic inflammatory bowel disease and cancer. *Hepatogastroenterology*. 2000 Jan-Feb; 47 (31): 57-70. Review

Reuther-Madrid JY, Kashatus D, Chen S, Li X, Westwick J, Davis RJ, et al. The p65/RelA subunit of NF-kappaB suppresses the sustained, antiapoptotic activity of Jun kinase induced by tumor necrosis factor. *Molecular and Cellular Biology*. 2002;22(23):8175-83. Epub 2002/11/06.

Rosenstiel P, Sina C, Franke A, Schreiber S. Towards a molecular risk map--recent advances on the etiology of inflammatory bowel disease. *Seminars in immunology*. 2009;21(6):334-45. Epub 2009/11/21.

Roy PK, Rashid F, Bragg J, Ibdah JA. Role of the JNK signal transduction pathway in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2008;14(2):200-2. Epub 2008/01/12.

Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J, Hamling J, Koop I, Groessner B, et al. Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1beta in relapse of Crohn's disease. *Lancet*. 1999;353(9151):459-61. Epub 1999/02/16.

Sina C, Schreiber S, Hoffmann JC, Rogler G, Scholmerich J, Zeitz M, et al. [The German competence network inflammatory bowel disease (KNCED) -- network research leads to the identification of the cause of disease and to the improvement in patient care]. *Med Klin (Munich)*. 2006;101(2):161-5. Epub 2006/02/28.

Sprent J, Surh CD. T cell memory. *Annual Review of Immunology*. 2002;20:551-79. Epub 2002/02/28.

Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *Journal of Immunology*. 1990;145(11):3796-806. Epub 1990/12/01.

Swanek JL, Cobb MH, Geppert TD. Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Molecular and Cellular Biology*. 1997;17(11):6274-82. Epub 1997/10/29.

Tang G, Minemoto Y, Dibling B, Purcell NH, Li Z, Karin M, et al. Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature*. 2001;414(6861):313-7. Epub 2001/11/20.

Thakur A, Wang X, Siedlak SL, Perry G, Smith MA, Zhu X. c-Jun phosphorylation in Alzheimer disease. *Journal of Neuroscience Research*. 2007;85(8):1668-73. Epub 2007/04/25.

Touchard E, Omri S, Naud MC, Berdugo M, Deloche C, Abadie C, et al. A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase for the treatment of endotoxin-induced uveitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2010;51(9):4683-93. Epub 2010/04/16.

Tournier C, Thomas G, Pierre J, Jacquemin C, Pierre M, Saunier B. Mediation by arachidonic acid metabolites of the H2O2-induced stimulation of mitogen-activated protein kinases (extracellular-signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase). *European Journal of Biochemistry*. 1997 Mar 1;244(2):587-95.

van Montfrans C, Peppelenbosch M, te Velde AA, van Deventer S. Inflammatory signal transduction in Crohn's disease and novel therapeutic approaches. *Biochemical Pharmacology*. 2002;64(5-6):789-95. Epub 2002/09/06.

Varfolomeev EE, Ashkenazi A. Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell*. 2004;116(4):491-7. Epub 2004/02/26.

Ventura JJ, Cogswell P, Flavell RA, Baldwin AS, Jr., Davis RJ. JNK potentiates TNF-stimulated necrosis by increasing the production of cytotoxic reactive oxygen species. *Genes & Development*. 2004;18(23):2905-15. Epub 2004/11/17.

Waetzig GH, Schreiber S. Review article: mitogen-activated protein kinases in chronic intestinal inflammation - targeting ancient pathways to treat modern diseases. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2003;18(1):17-32. Epub 2003/07/10.

Waetzig GH, Seegert D, Rosenstiel P, Nikolaus S, Schreiber S. p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease. *Journal of Immunology*. 2002;168(10):5342-51. Epub 2002/05/08.

Waetzig V, Herdegen T. Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage. *Trends in pharmacological sciences*. 2005;26(9):455-61. Epub 2005/08/02.

Wang J, Van De Water TR, Bonny C, de Ribaupierre F, Puel JL, Zine A. A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against both aminoglycoside and acoustic trauma-induced auditory hair cell death and hearing loss. *The Journal of neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23(24):8596-607. Epub 2003/09/19.

Wiegler K, Bonny C, Coquoz D, Hirt L. The JNK inhibitor XG-102 protects from ischemic damage with delayed intravenous administration also in the presence of recombinant tissue plasminogen activator. *Cerebrovascular Diseases*. 2008;26(4):360-6. Epub 2008/08/30.

Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature Protocols*. 2007;2(3):541-6. Epub 2007/04/05.

Wirtz S, Neurath MF. Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. *International Journal of Colorectal Disease*. 2000;15(3):144-60. Epub 2000/08/23.

Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448(7152):427-34. Epub 2007/07/27.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Thomas Herdegen bedanken für das vielseitige Thema sowie die stete und engagierte Betreuung.

Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei meiner Betreuerin Dr. Kirstin Reinecke bedanken für ihr Engagement und ihre Unterstützung.

Ein weiterer Dank gilt Frau Dipl.pharm. Franziska Dierck und Frau Dipl.pharm. Wibke Rößner, mit denen ich am vorliegenden Projekt gearbeitet habe. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des pharmakologischen Instituts für die Zeit, die ich dort haben durfte.

Abschließend bedanke ich mich bei meinen Eltern Dr. Hermann und Doris Niedergassel sowie bei meinen Brüdern Dr. Benjamin und Dr. Tim Alexander Niedergassel sowie meinem Freund Magnus Buske für ihre Unterstützung.

Eigenständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, ganz oder in Teilen noch nicht als Prüfungsleistung vorgelegt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Sämtliche Stellen der Arbeit, die benutzten Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, habe ich durch Quellenangaben kenntlich gemacht.



*Leonie Niedergassel
Baltrumweg 13
33729 Bielefeld*

Hochschule:

April 2007	Johannes-Gutenberg- Universität Mainz Medizinstudium, vorklinischer Abschnitt Wissenschaftliche Hilfskraft Anatomie
März 2009	I. Staatsexamen Medizin Durchschnitt: 2,5
Seit April 2009	CAU Kiel Medizinstudium, klinischer Abschnitt
Seit April 2009	Institut für klinische und experimentelle Pharmakologie : Aufnahme der Promotion
Mai 2013	II. Staatsexamen und Abschluss des Medizinstudiums an der CAU Kiel Durchschnitt: 2,0

Förderungen:

Stipendiatin der Studienstiftung des Deutschen Volkes (Aufnahme 2007)

Akademien:

Sommerakademie der Studienstiftung auf Schloss Salem

Teilnahme am literaturwissenschaftlichen Programm „Alter“

Sommerakademie der Studienstiftung in St. Johann (IT)

Teilnahme am Geschichtsseminar „Karriere und Aufstieg in der Neuzeit“

Sommerakademie der Studienstiftung auf Schloss Salem

Medizinisches Seminar: „Neurobiologie des Schmerzes“

Sonstige Förderungen:

Jan. – Aug. 2004	Schülerakademie der Werner- Gehring-Stiftung Akademie zur Förderung begabter Schüler (Thema: Linguistik)
Okt.2004- Feb.2005	Fortgeschrittenenakademie (Thema: Wirtschaftswissenschaften mit Schwerpunkt Europa)
Nov.2005	1. Preis Landeswettbewerb Alte Sprachen Certamen Carolinum

Appendix

Die nachfolgende Zusammenstellung der Rohdaten dieser Arbeit ist identisch mit einem Bericht, der der Firma XIGEN (Lausanne) zugesandt wurde. Daher liegen Primärdaten und Ergebnisse hier in der englischen Version vor.

Appendix I: DAI + Gewichtsverlust

Final data: XG102_sc_3

Protocol TNBS: d 0 XG102 sc: d 0 end: d 7

Tl/code	DAI								weight loss (%)						
	d1	D2	d3	d4	d5	d6	d7		d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7
saline															
#30	7	4	3	2	0	0	0		10,4	7,4	1,8	-6,1	-6,1	-8	-8
#41	9	6	1	3	2	0	0		11,1	9,9	4,1	1,2	-0,6	0	0,1
#3	6	3	3	0	1	0	0		6,3	2,9	0,6	-0,6	1,7	-1,7	-1,7
#4	9	4	4	1	1	1	0		14,2	8	7,4	1,9	1,2	0,6	-0,6
#15	6	6	5	2	2	1	1		6,5	6	3,8	6	7,1	3,8	2,2
#16	11	10	7	4	3	1	0		14	20,4	10,2	6,5	3,2	0,5	-1,1
#22	5	5	5	3	2	1	1		3,9	2,8	1,1	4,5	6,2	4,5	3,9
mean	7,6	5,4	4,0	2,1	1,6	0,6	0,3		9,5	8,2	4,1	1,9	1,8	0,0	-0,7
SEM	1	1	1						0,4	1,3	1,2				
100 µg/kg															
#32	6	3	3	3	1	1	1		8,4	4,5	2,8	4,5	2,2	3,4	5
#36	6	3	2	2	2	2	0		7,8	3	0	-0,6	-3,6	-4,8	-3
#28	2	2	0	0	0	0	0		-2,3	-3,4	-0,6	-0,6	4	-0,6	-6,2
#17	5	2	2	2	0	0	0		1,7	-2,2	-0,6	-0,6	-1,1	-0,6	-0,6
#18	2	2	0	0	0	0	0		-0,6	-1,1	-0,6	0	-0,6	-0,6	0
mean	4,2	2,4	1,4	1,4	0,6	0,6	0,2		3,0	0,2	0,2	0,5	0,2	-0,6	-1,0
SEM	0	0	0,5						0,3	0,8	1,4				

\$ submucosa length these parameter could be determined in few mice only. Therefore they are not included in the histological score
 \$ submucosa score
 \$\$ histological score sum of ulcer, crypts and infiltration from each mouse

Final data: XG102_sc_4

Protocol TNBS: d 0 XG102 sc: d 0 sulfasalazine po: daily end: d 3

TI/code	DAI				weight loss (%)		
	d1	d2	d3		d1	d2	d3
saline							
#A1	5	4	4		16,4	8,2	5,7
#A4	11	10	8		12,9	17,4	16,9
#A8	7	7	4		14,3	12,6	6,9
#A9	10	12	8		9,8	17,3	24,9
#A16	10	8	6		9,1	20,7	15,9
mean	8,6	8,2	6,0		12,5	15,2	14,1
SEM	1,1	1,4	0,9		1,4	2,2	3,5
10 µg/kg							
#A10	4	4	4		5,1	8,4	7,3
#A22	11	8	5		13,7	20,3	12,1
mean	7,5	6,0	4,5		9,4	14,4	9,7
SEM	3,5	2	0,5		4,3	6	2,4
100 µg/kg							
#A24	4	4	3		6,6	5,4	1,2
#A2	5	5	3		12,6	11,1	4,6
#A3	3	3	3		3,9	4,5	2,2
#A11	7	4	3		11,4	9,2	4,3
#A21	4	1	1		7,6	2,7	3,3
#A5	4	4	2		7,4	5,1	0
mean	4,5	3,5	2,5		8,3	6,3	2,6
SEM	0,6	0,6	0,3		1,3	1,3	0,7
* ** *							
sulfasalazine 10 mg/kg							
#A19	12	6	2		16	18,6	8,5
#A14	1	2	3		4,7	1,8	0,6
#A13	4	6	6		8,4	0	-4,5
#A12	4	2	2		8	9,6	7
mean	5,3	4,0	3,3		9,3	7,5	2,9
SEM	2,4	1,2	0,9		2,4	4,2	3
* *							

\$ submucosa length these parameter could be determined in few mice only. Therefore they are not included in the histological score
 \$ submucosa score
 \$\$ histological score sum of ulcer, crypts and infiltration from each mouse

Final data: XG102+10X_sc_5-6

Protocol TNBS (80µl/100µl): d 0 XG102/XG10X: d 0 end: d 3 10 wks male

TI/code	DAI				weight loss (%)		
	d1	d2	d3		d1	d2	d3
saline							
#81	5	3	3		3,3	2,9	1,1
#92	7	5	4		12	11,1	5,2
#102	3	1	1		4,1	1,4	1,8
#109	7	9	2		11,9	11,9	9,7
#111	2	0	0		0,9	-2,2	-3,6
#118	3	3	0		10,3	1,8	-1,8
#119	11	8	7		14,5	16,7	11,3
mean	5,4	4,1	2,4		8,1	6,2	3,4
SEM							
XG102- 100 µg/kg							
#73	9	6	5		11,6	6,9	1,9
#74	3	1	0		2,7	2	0,5
#77	1	3	2		3,7	2,8	-1,8
#83	5	0	0		2,7	0,4	-0,2
#86	0	3	3		0,7	1,6	2,1
#99	6	3	3		9,7	3,8	2,5
#106	2	1	1		9,7	3,4	1,3
mean	3,7	2,4	2,0		5,8	3,0	0,9
SEM							
XG10X- 50 µg/kg							
#72	2	2	1		6,3	6,7	2,7
#82	1	0	0		1,4	0,7	-2,8
#94	4	3	0		7,2	3,1	0,4
#97	4	4	2		8,1	7,1	0
#100	4	1	1		8,3	2,2	2,6
#105	3	3	2		4,9	1,8	0,4
#107	3	0	0		3,7	-1,6	-1,2

#108	6	5	2		9,7	3,4	-1,7
#115	4	0	0		6	-0,9	-2,2
mean	3,4	2,0	0,9		6,2	2,5	-0,2
SEM							
Sulfasalazine 10 mg/kg							
#76	3	1	4		4,1	1,4	0,5
#87	3	3	0		4,9	1,5	-1
#90	1	3	0		2,4	1	0,7
#91	3	2	0		4,7	0	-3,7
#93	3	0	2		2,8	0,5	-1,8
#96	11	8	8		11,6	17,3	19,3
#103	4	1	0		7,5	1,3	-0,2
#110	5	2	2		1,3	0,8	-1,3
mean	4,1	2,5	2,0		4,9	3,0	1,6
SEM							

\$ submucosa length these parameter could be determined in few mice only. Therefore they are not included in the histological score
 \$ submucosa score
 \$\$ histological score sum of ulcer, crypts and infiltration from each mouse

Final data: XG10X_pre1

Protocol TNBS: d 0 XG10X-sc-pre: d-12 h, d-24 h end: d 3 7 wks old female

TI/code	DAI				weight loss (%)		
	d1	d2	d3		d1	d2	d3
NaCl							
#P6	9	10	10		13,6	23,7	31,4
#P7	7	7	6		12,1	14,3	7,1
#P5	12	8	12		16,2	22,8	31,3
#P10	5	3	3		4,9	3,8	4,1
mean	8,3	7,0	7,8		11,7	16,2	18,5
SEM							
d-12 h							
#P11	7	8	8		13,7	19,2	23,6
#P13	6	4	3		10,3	10,3	5,5
mean	6,5	6,0	5,5		12,0	14,8	14,6
SEM							
d-24 h							
#P4	10	8	10		15,6	22	28
#P8	12	12	12		17,1	23,8	27,4
#P14	8	9	10		10,5	15,7	20,9
mean	10,0	9,7	10,7		14,4	20,5	25,4
SEM							

\$ submucosa length these parameter could be determined in few mice only. Therefore they are not included in the histological score
 \$ submucosa score
 \$\$ histological score sum of ulcer, crypts and infiltration from each mouse

Final data: XG102_iv_3- 4

Protocol TNBS: d 0 XG102 iv: d 0 end: d 3 8 wks female

TI/code	DAI				weight loss (%)		
	d1	d2	d3		d1	d2	d3
PBS							
#43iv	9	8	5		13	10,7	4,7
#45iv	6	3	4		9,5	2,8	-1,1
#47iv	6	4	0		9,7	5,4	-1,1
#50iv	10	12	12		9,1	16,5	19,3
mean	7,6	5,7	5,2		9,1	8,0	6,2
SEM	0,8	1,0	1,4		1,0	2,1	3,1
1µg/kg							
#35iv	3	3	3		2,7	4,9	2,7
#36iv	12	4	5		16,8	13,2	10,6
#39 iv	11	8	4		12,1	10	8,7
#42iv	6	4	4		10,1	7,9	4,8
#52iv	3	0	0		1,1	0	-0,6
mean	5,6	3,2	2,6		6,9	4,0	2,6
SEM	0,7	0,5	0,4		8,6	1,1	0,9

\$ submucosa length these parameter could be determined in few mice only. Therefore they are not included in the histological score
 \$ submucosa score
 \$\$ histological score sum of ulcer, crypts and infiltration from each mouse

Final data: XG102_po_1

Protocol TNBS(1,5 mg in 80 µl): d 0 Ethanol 47,5% XG102 po: d 0 end: d 3 Sevofluran female, male 8-12 wks

TI/code	DAI				weight loss (%)			gross pathology
	d1	d2	d3		d1	d2	d3	
saline								
#1	6	8	7		7,6	8,7	1,4	1,5
#3	6	3	2		7,2	4,6	-1	0,5
#6	5	4	5		14,3	6,9	2,9	1,5
#8	2	2	1		5,8	7,7	2,4	0,0
#12	3	3	4		4,4	3,5	0	1
#13	8	6	3		7,9	8,6	3,2	1
mean	5,0	4,3	3,7		7,9	6,7	1,5	0,9
SEM	0,9	0,9	0,9		1,4	0,9	0,7	0,1
XG 102-1 mg/kg_po								
#2	6	7	3		8,7	12,2	4,1	1,5
#5	5	2	0		3,8	0,7	-0,7	0,5
#7	3	2	2		4	0,8	0,4	1,5
#9	4	3	3		10	5	5	1
#10	7	2	1		11,6	7,2	2,8	0,5
#11	3	3	3		3,1	1,6	2,7	0
mean	4,7	3,2	2,0		6,9	4,6	2,4	0,8
SEM	0,7	0,8	0,4		1,5	1,9	0,9	0,1

\$ submucosa length these parameter could be determined in few mice only. Therefore they are not included in the histological score
 \$ submucosa score
 \$\$ histological score sum of ulcer, crypts and infiltration from each mouse

Final data: XG102_po_2

Protocol TNBS(1,5 mg in 80 µl): d 0 Ethanol 47,5% XG102 po: d 0/1 Sulfasalazine po: daily end: d 3 Sevofluran female,male 8-12 wks

TI/code	DAI				weight loss (%)				gross pathology
	d1	d2	d3		d1	d2	d3		
saline									
#18	3	2	2		4,6	0,4	-2,5		1
#26	3	5	2		4,5	1,6	0,8		0
#34	6	5	5		6,5	3,8	2,1		0,5
mean	4,0	4,0	3,0		5,2	1,9	0,1		0,5
SEM	1,0	1,0	1,0		0,7	1,0	1,4		0,3
XG 102-1 mg/kg_po									
*#15	3	4	0		3,5	0,4	-0,4		0,5
#19	4	8	5		8,1	16,6	13,6		1
#28	7	7	1		12,9	12,5	4,4		0,5
*#31	3	2	0		3	0	-2,1		0
mean	6,0	5,3	1,5		6,9	7,4	3,9		0,5
SEM	1,0	1,4	1,2		2,3	4,0	3,0		0,2
* second application of XG po									
Sulfasalazine 10mg/kg									
#21	3	2	0		3,5	0	0		1
#23	4	2	1		5,3	0,4	1,8		0,5
#33	3	3	3		4,3	2,6	4,7		0,5
mean	3,3	2,3	1,3		4,4	1,0	2,2		0,7
SEM	0,2	0,2	0,8		0,4	0,7	1,4		0,2

\$ submucosa length these parameter could be determined in few mice only. Therefore they are not included in the histological score
 \$ submucosa score \$\$ histological score sum of ulcer, crypts and infiltration from each mouse

Final data: XG102_po_3

Protocol TNBS (1,5mg in 80µl): d0 Ethanol 47,5 % XG102 po/sc: d 0/1 end d3 Sevofluran male 9 wks

TI/code	DAI				weight loss (%)				gross pathology
	d1	d2	d3		d1	d2	d3		
saline									
#50	4	3	1		7	4,9	3,3		1
#49	6	5	2		5,3	2,9	0,4		0,5
#54	6	1	0		6,5	3	0		0
#36	5	4	2		3,8	-0,9	-1,7		0
#52	6	3	0		7	2,9	0,4		0
#40	1	3	3		4,1	1,2	2,9		1
#37	6	3	3		7,2	4,2	1,3		0,5
mean	4,9	3,1	1,6		5,8	2,6	0,9		0,4
SEM	0,6	0,5	0,5		0,4	0,6	0,7		0,2
XG 1 mg/kg_po									
#38	3	3	1		1,7	1,7	2,1		0,5
#47	5	3	5		1,8	1,3	2,2		0,5
*#45	1	0	2		2,5	0	-0,4		0
#48	3	2	0		2,2	-2,6	-3		0
#55	4	2	0		6,1	0,4	-0,4		0
*#39	4	1	4		5,5	4,6	5,9		1
mean	3,3	1,8	2,0		3,3	0,9	1,1		0,3
SEM	0,6	0,4	0,9		0,7	1	1,3		0,2
* second application of XG po									
1 00 µg/kg_sc									
#53	5	3	3		4,2	5,5	3,4		1,5
#44	9	8	4		11,8	9,9	9,3		1
#56	3	3	1		4,3	3,8	3		0
#35	3	5	5		3,2	4,1	1,4		1
#58	1	1	1		4,7	1,2	1,6		0
#59	6	3	2		5,6	1,3	-1,7		0
mean	4,5	3,8	2,7		5,6	4,3	2,8		0,6
SEM	1	1	0,7		1,3	1,2	1,5		0,3

\$	submucosa length	these parameter could be determined in few mice only. Therefore they are not included in the histological score
\$	submucosa score	\$\$ histological score sum of ulcer, crypts and infiltration from each mouse

Appendix II H+E Scoring

Final data: XG102_sc_1-3

Protocol TNBS: d 0 XG102 sc: d 0 end: d 7 females 7 wks old

Tl/code	medial colon (mc)							distal (rectal) colon (dc)					
	ulcer	crypts	infiltration	submucosa length (µm) \$	submucosa score \$	histological score \$\$		ulcer	crypts	infiltration	submucosa length (µm) \$	submucosa score \$	histological score \$\$
XG 100µg/kg													
#28	2	1	0	\$	\$	3		1	1	0	\$	\$	2
#17	2	1	0	\$	\$	3		2	1	0	\$	\$	3
#18	1	1	0	\$	\$	2		\$	\$	\$	\$	\$	
#32	2	2	0	\$	\$	4		2	2	2	\$	\$	6
#36	2	2	0	\$	\$	4		1	1	1	\$	\$	3
mean	1,8	1,4	0,0			3,2		1,5	1,3	0,8			3,5
SEM	0,2	0,2	0,0			0,4		0,3	0,3	0,5			0,9
NaCl													
#3	1	1	0	\$	\$	2		1	1	0	\$	\$	2
#4	2	2	0	\$	\$	4		1	1	0	\$	\$	2
#15	2	1	0	\$	\$	3		2	1	0	\$	\$	3
#16	2	1	0	\$	\$	3		2	1	1	\$	\$	4
#22	2	1	0	\$	\$	3		1	1	1	\$	\$	3
#30	1	1	0	\$	\$	2		2	1	1	\$	\$	4
#40	1	1	0	\$	\$	2		2	1	1	\$	\$	4
mean	1,6	1,1	0,0			2,7		1,6	1,0	0,6			3,1
SEM	0,2	0,1	0,0			0,3		0,2	0,0	0,2			0,3

\$ submucosa length these parameter could be determined in few mice only. Therefore they are not included in the histological score
 \$ submucosa score
 \$\$ histological score sum of ulcer, crypts and infiltration from each mouse

Final data: XG102_sc_4

Protocol TNBS: d 0 XG102 sc: d 0 end: d 3 females 7 wks old

TI/code	medial colon (mc)							distal (rectal) colon (dc)					
	ulcer	crypts	infiltration	submucosa length (µm)\$	submucosa score \$	histological score \$\$		ulcer	crypts	infiltration	submucosa length (µm)\$	submucos a score \$	histological score \$\$
saline													
#A1	2	1	0	\$	\$	3		3	2	2	\$	\$	7
#A4	2	2	2	\$	\$	6		2	2	1	\$	\$	5
#A8	2	2	1	\$	\$	5		2	2	1	\$	\$	5
#A9	2	1	1	\$	\$	4		2	2	2	\$	\$	6
#A16	2	1	1	\$	\$	4		3	3	2	\$	\$	8
mean	2,0	1,4	1,0			4,4		2,4	2,2	1,6			6,2
SEM	0,0	0,2	0,3			0,2		0,2	0,2	0,2			0,6
10 µg/kg													
#A10	1	1	0	\$	\$	2		2	1	0	\$	\$	3
#A22	2	2	1	\$	\$	5		1	1	1	\$	\$	3
mean	1,5	1,5	0,5			3,5		1,5	1,0	0,5			3,0
SEM	0,5	0,5	0,5			0,3		0,5	0,0	0,5			0,3
* * **													
100 µg/kg													
#A24	1	1	0	\$	\$	2		1	1	0	\$	\$	2
#A2	1	1	1	\$	\$	3		2	2	1	\$	\$	5
#A3	1	1	0	\$	\$	2		2	1	1	\$	\$	4
#A11	1	1	0	\$	\$	2		2	1	0	\$	\$	3
#A21	1	1	0	\$	\$	2		1	1	1	\$	\$	3
#A5	1	1	0	\$	\$	2		1	2	0	\$	\$	3
mean	1,0	1,0	0,2			2,2		1,5	1,3	0,5			3,3
SEM	0,0	0,0	0,2			0,2		0,2	0,2	0,2			0,4
** * *													
sulfasalazine 10 mg/kg													
#A19	1	1	0	\$	\$	2		2	2	1	\$	\$	5
#A14	1	1	0	\$	\$	2		2	2	1	\$	\$	5
#A13	1	1	0	\$	\$	2							
#A12								2	2	1	\$	\$	5
mean	1,0	1,0	0,0			2,0		2,0	2,0	1,0			5,0
SEM	0,0	0,0	0,0			0,2		0,0	0,0	0,0			0,2
** *													

* = p<0,05

** = p<0,01

§ n.d.

\$ submucosa length

\$ submucosa score

\$\$ histological score

these parameter could be determined in few mice only. Therefore they are not included in the histological score

sum of ulcer, crypts and infiltration from each mouse

Final data: XG102+10X_sc_5-6

Protocol TNBS (80µl/100µl): d 0 XG102/XG10X: d 0 end: d 3 10 wks male

Tl/code				medial colon (mc)							distal colon (dc)		
	ulcer	crypts	infiltration	submucosa length (µm) \$	submucosa score \$	histological score \$\$		ulcer	crypts	infiltration	submucosa length (µm) \$	submucosa score \$	histological score \$\$
saline													
#102-81	1	2	1	\$	\$	4		2	2	2	\$	\$	6
#102-91	2	2	2	\$	\$	6		2	2	2	\$	\$	6
#102-102	2	2	2	\$	\$	6		2	2	2	\$	\$	6
#102-119	1	2	2	\$	\$	5		2	2	2	\$	\$	6
#102-118	1	2	1	\$	\$	4		1	1	2	\$	\$	4
#102-111	2	2	2	\$	\$	6		1	2	2	\$	\$	5
#102-109	2	2	2	\$	\$	6		2	2	2	\$	\$	6
mean	1,6	2	1,6	\$	\$	5,3		1,6	1,9	2	\$	\$	5,6
SEM	0,1	0	0,2	\$	\$	0,3					\$	\$	
				\$	\$						\$	\$	
XG102 100µg/kg													
#102-83	1	1	1	\$	\$	3		1	0	1	\$	\$	3
#102-86	1	1	1	\$	\$	3		1	0	1	\$	\$	2
#102-99	0	0	1	\$	\$	1		1	1	1	\$	\$	3
#102-106	1	0	1	\$	\$	2		1	1	0	\$	\$	2
mean	0,8	0,5	1	\$	\$	2,3		1	0,5	0,8	\$	\$	2,5
SEM	0,3	0,3	0	\$	\$	0,5		0,4	0	0,3	\$	\$	0,3
				\$	\$						\$	\$	
XG10X 50µg/kg													
#102-97	0	1	0	\$	\$	1		1	1	0	\$	\$	2
#102-100	1	1	1	\$	\$	3		1	1	1	\$	\$	3
#102-105	1	0	0	\$	\$	1		2	1	0	\$	\$	3
#102-104	1	0	0	\$	\$	1		1	1	2	\$	\$	4
#102-108	1	0	0	\$	\$	1		1	1	1	\$	\$	3
#102-115	1	0	1	\$	\$	2		1	1	1	\$	\$	3
mean	0,8333333333	0,3333333333	0,3333333333	\$	\$	1,5		1,2	1	1	\$	\$	3
SEM	0,2	0,1	0,1	\$	\$	0,2		0,2	0	0,2	\$	\$	0,3
				\$	\$						\$	\$	

**Sulfasalazine
10 mg/kg**

				\$	\$					\$	\$	
#102-103	2	2	2	\$	\$	6	2	2	2	\$	\$	6
#102-110	2	1	1	\$	\$	4	1	1	2	\$	\$	4
mean	2	1,5	1,5	\$	\$	5	1,5	1,5	2	\$	\$	5
SEM	0	0,5	0,5	\$	\$	1	0,5	0,5	0	\$	\$	1

\$ submucosa length these parameter could be determined in few mice only. Therefore they are not included in the histological score
 \$ submucosa score
 \$\$ histological score sum of ulcer, crypts and infiltration from each mouse

Final data: XG102_po_1

Protocol TNBS(1,5 mg in 80 µl): d 0 Ethanol 47,5% XG102 po: d 0 end: d 3
Sevofluran female, 8-12 wks

TI/code	ulcer	crypts	infiltration	medial colon (mc) submucosa length (µm) \$	submucosa score \$	histological score \$\$	ulcer	crypts	infiltration	distal colon (dc) submucosa length (µm) \$	submucosa score \$	histological score \$\$
---------	-------	--------	--------------	---	--------------------	-------------------------	-------	--------	--------------	---	--------------------	-------------------------

saline

#102-1	2	2	1	\$	\$	5	1	1	1	\$	\$	3
#102-3	1	1	1	\$	\$	3	1	1	0	\$	\$	2
#102-6	0	1	1	\$	\$	2	1	1	1	\$	\$	3
#102-8	1	1	0	\$	\$	2	1	1	1	\$	\$	3
#102-12	1	1	1	\$	\$	3	2	1	1	\$	\$	4
#102-13	1	1	1	\$	\$	3	2	2	2	\$	\$	6
mean	1	1,2	0,7	\$	\$	3	1,2	1,2	1	\$	\$	3,5
SEM	0,3	0,2	0,2	\$	\$	0,3	0,1	0,2	0,3	\$	\$	0,6

**XG 102-
1mg/kg**

#102-2	1	1	0	\$	\$	2	2	2	1	\$	\$	3
#102-5	1	1	0	\$	\$	2	1	1	0	\$	\$	2
#102-7	1	1	0	\$	\$	2	1	1	1	\$	\$	3
#102-9	1	1	0	\$	\$	2	2	2	0	\$	\$	4
#102-10	1	1	1	\$	\$	3	1	1	1	\$	\$	3
#102-11	1	1	1	\$	\$	3	1	1	1	\$	\$	3
mean	1	1	0,2	\$	\$	2,2	1,2	1,2	0,7	\$	\$	3
SEM	0	0	0,1	0,1		0,1	0,1	0,1	0,3			0,3

\$ submucosa length these parameter could be determined in few mice only. Therefore they are not included in the histological score
 \$ submucosa score
 \$\$ histological score sum of ulcer, crypts and infiltration from each mouse

Final data: XG102_po_2

Protocol TNBS(1,5 mg in 80 µl): d 0 Ethanol 47,5% XG102 po: d 0 end: d 3
Sevofluran female, 8-12 wks

Tl/code				medial colon (mc)							distal colon (dc)		
	ulcer	crypts	infiltration	submucosa length (µm) \$	submucosa score \$	histological score \$\$		ulcer	crypts	infiltration	submucosa length (µm) \$	submucosa score \$	histological score \$\$
saline													
#102-18	2	2	1	\$	\$	5		3	3	3	\$	\$	9
#102-26	3	3	2	\$	\$	8		2	3	2	\$	\$	7
#102-34	3	2	2	\$	\$	7		2	2	2	\$	\$	6
mean	2,7	2,2	1,7	\$	\$	6,7		2,2	2,7	2,2	\$	\$	7,2
SEM	0,2	0,2	0,2			0,9		0,2	0,2	0,2			0,9
XG102-1mg/kg													
#102-15	1	0	1	\$	\$	2		2	2	2	\$	\$	6
#102-28	1	1	1	\$	\$	3		1	1	1	\$	\$	3
#102-31	0	1	1	\$	\$	2		1	2	2	\$	\$	5
#102-19	1	0	0	\$	\$	1		1	1	1	\$	\$	3
mean	0,75	0,5	0,75	\$	\$	2		1	1,5	1,5	\$	\$	4,3
SEM	0,3	0,3	0,3	\$	\$	0,3		0,3	0,3	0,3	\$	\$	0,8
Sulfasalazine 10mg/kg													
#102-21	1	1	0	\$	\$	2		2	2	2	\$	\$	6
#102-33	2	2	2	\$	\$	6		2	1	1	\$	\$	4
#102-23	2	2	1	\$	\$	5		2	1	1	\$	\$	5
mean	1,7	1,7	1	\$	\$	4,2		2	1,2	1,2	\$	\$	5
SEM	0,2	0,2	0,6	\$	\$	1,1		0	0,2	0,2	\$	\$	0,6

\$ submucosa length these parameter could be determined in few mice only. Therefore they are not included in the histological score
 \$ submucosa score
 \$\$ histological score sum of ulcer, crypts and infiltration from each mouse

Final data: XG102_po_3

Protocol TNBS(1,5 mg in 80 µl): d 0 Ethanol 47,5% XG102 po: d 0 end: d 3
Sevofluran female, 8-12 wks

TI/code				medial colon (mc)							distal colon (dc)		
	ulcer	cry pts	infiltra tion	submucosa length (µm) \$	submucosa score \$	histological score \$\$		ulcer	cry pts	infiltra tion	submucosa length (µm) \$	submucosa score \$	histological score \$\$
saline													
#102-50	2	2	2	\$	\$	6		2	2	2	\$	\$	6
#102-49	1	1	2	\$	\$	4		1	2	2	\$	\$	5
#102-54	2	1	1	\$	\$	4		2	2	1	\$	\$	5
#102-36	2	2	2	\$	\$	5		2	2	1	\$	\$	5
#102-52	2	2	1	\$	\$	5		3	2	2	\$	\$	7
#102-40	2	1	1	\$	\$	4		1	1	2	\$	\$	4
#102-37	3	3	3	\$	\$	9		2	2	2	\$	\$	6
mean	2	1,6	1,6	\$	\$	5,3		1,7	1,7	1,6	\$	\$	5,3
SEM	0,1	0,3	0,3	\$	\$	0,7		0,3	0,2	0,2	\$	\$	0,4
XG102 1mg/kg													
#102-38	2	2	2	\$	\$	6		1	1	0	\$	\$	2
#102-47	1	0	1	\$	\$	2		1	1	1	\$	\$	3
#102-45	1	0	0	\$	\$	1		1	1	1	\$	\$	3
#102-48	1	1	0	\$	\$	2		1	1	1	\$	\$	3
#102-55	1	0	0	\$	\$	1		2	1	1	\$	\$	4
#102-39	1	1	1	\$	\$	3		2	0	0	\$	\$	2
mean	1,2	0,7	0,7	\$	\$	2,5		1,2	0,7	0,7	\$	\$	2,7
SEM	0,2	0,2	0,2	\$	\$	0,8		0,1	0,2	0,1	\$	\$	0,2
XG102 100µg/kg													
#102-53	1	1	1	\$	\$	3		2	2	2	\$	\$	6
#102-44	1	1	1	\$	\$	3		1	1	2	\$	\$	4
#102-56	1	1	0	\$	\$	2		1	1	1	\$	\$	3
#102-35	1	1	0	\$	\$	2		2	2	2	\$	\$	6
#102-58	1	1	0	\$	\$	2		1	0	1	\$	\$	2
#102-59	1	1	1	\$	\$	3		1	0	1	\$	\$	2

mean	1	1	0,5	\$	\$	2,5		1,2	1	1,5	\$	\$	3,7
SEM	0	0	0,2	\$	\$	0,2		0,1	0,4	0,2	\$	\$	0,6

\$ submucosa length these parameter could be determined in few mice only. Therefore they are not included in the histological score
 \$ submucosa score \$\$ histological score sum of ulcer, crypts and infiltration from each mouse